# Elektrophoretische Untersuchungen an der Alpha-Glycerophosphatdehydrogenase aus Kaninchenmuskel

FRITZ EBNER

1968

AUS DEM PHYSIOLOGISCH-CHEMISCHEN INSTITUT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Direktor: Prof. Dr. Dr. Th. Bücher

# ELEKTROPHORETISCHE UNTERSUCHUNGEN AN DER ALPHA-GLYCEROPHOSPHATDEHYDROGENASE AUS KANINCHENMUSKEL

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Fritz Ebner
aus
Freising

1968

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

| | |
|---|---|
| Berichterstatter : | Prof. Dr. Dr. Bücher |
| Mitberichterstatter : | |
| Dekan : | Prof. Dr. F. Marguth |
| Tag der mündlichen Prüfung : | 15. 10. 1968 |

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

## EINLEITUNG

1959 war das Geburtsjahr der neuen Methode der Diskelektrophorese in Polyacrylamidgel, geschaffen neben RAYMOND und WEINTRAUB ( 1 ) vor allem von ORNSTEIN und DAVIS ( 2 ). ORNSTEIN konnte außerdem die theoretischen Grundlagen der Methode erarbeiten. Mit ihr wurde es möglich, durch Kombination des Molekularsiebeffektes des Gels (SMITHIES konnte schon 1955 Fortschritte in der Elektrophorese mit dem Stärkegel erzielen ( 3 ) mit der Schaffung dünner und konzentrierter Zonen der aufgetragenen Ionen durch elektrische Effekte des diskontinuierlichen Puffersystems bedeutend verbesserte Trennungen als etwa im Vergleich zur Papierelektrophorese zu erzielen. (Das Zustandekommen des Wortes Diskelektrophorese ist durch das diskontinuierliche Puffersystem und durch das englische Wort für Scheibe "Disc" zu erklären, da ORNSTEIN und DAVIS diese Methode in Röhrchen ausführten, so daß sich die angefärbten Substanzen als Scheiben darstellen). Mit dieser Methode und der Zonenelektrophorese in Polyacrylamidgel sollte also darangegangen werden Untersuchungen an der Glycerophosphatdehydrogenase aus Kaninchenmuskel anzustellen. Das Enzym katalysiert folgende Reaktion :

Dihydroxyacetonphosphat + DPNH + $H^+$ ⇌ Glycerophosphat + $DPN^+$

Die Versuche sollten vor allem vor dem Hintergrund der Möglichkeit verschiedengestaltiger Proteinmoleküle ausgeführt werden, die die gleiche Funktion ausüben, der Isoenzyme, wie sie MARKERT und MØLLER ( 4 ) 1959 für die LDH nachweisen konnten, verbunden damit die Frage des Bestehens von verschiedenen Untereinheiten, also die Frage nach der Quartärstruktur des Enzyms. Es sollte sich also um Untersuchungen im großen Rahmen der Hypothese handeln, daß alle Dehydrogenasen aus gleichen oder ähnlichen Bestandteilen zusammengesetzt sind. Gleich nach Beginn der Arbeit zeigte sich aber das Problem von einer anderen Seite. Gewissermaßen als Riegel an dem Tor, das den Zugang zur oben erwähnten Fragestellung bildet, zeigte sich das Problem der Aggregation von Proteinen. Diese Arbeiten führten auf Gebiete, auf denen schon HALWER und HUGGINS et al. ( 5, 6 ) gearbeitet hatten. Jedoch mit anderen Methoden und, wenn auch nicht identischen, so doch ähnlichen Befunden und Ergebnissen.

## METHODIK

### Versuchsanordnungen

Die Apparatur ist aus zwei Polystyrolbehältern zusammengebaut, deren Radius 6 cm und deren Höhe 9 cm beträgt. Die beiden Gefäße werden ineinandergestellt, so daß die lichte Höhe vom Boden des unteren zum Boden des oberen 6 cm beträgt. Durch den Boden des oberen Gefäßes geht eine Stromzuleitung zur 4, 5 cm langen Platinelektrode für das untere Gefäß. Über das obere Elektrodengefäß wird eine Platte mit einem Radius von 6 cm gelegt, in ihr ist die zweite Elektrode befestigt. Im Boden des oberen Behälters sind 6 Bohrungen mit 1, 5 cm Ø, die wiederum mit Gummistopfen verschlossen sind. Durch diese Stopfen werden die eigentlichen Elektrophoreseröhrchen eingeführt, die dann das Polyacrylamidgel enthalten. Die Glasröhrchen sind 8, 5 cm lang mit einem Innendurchmesser von 4 mm. Die Gelhöhe in den Röhrchen beträgt 5 cm.

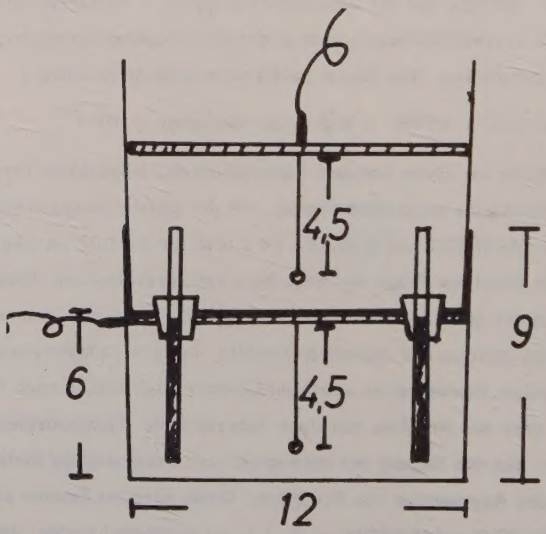



Abb. 1 : Bild der Elektrophoreseapparatur. Größenangaben in cm.

Zur Polymerisation werden die Röhrchen an der Unterseite mit einem Gummistopfen verschlossen, in einen Ständer gebracht und unter eine UV - Lampe gestellt. Den Ständer stellt eine Scheibe mit einem Radius von 6 cm und einer Dicke von 1, 5 cm dar. In einem Umlauf auf der Scheibe sind 8 Löcher mit einem Ø von 6 mm angebracht.

Um das Gel zu zerschneiden wird es auf einen Block mit einer 2 mm tiefen Rinne gelegt. In dem Block sind senkrecht zur Längsachse des Gels Kerben in einem Abstand von 1 mm eingefräst, so daß das Gel mit Hilfe eines feinen Drahtes in 1 mm Schnitte zerlegt werden kann.

Wurden die Gele direkt im Photometer ausgewertet, so werden sie zwischen zwei Objektträger, die auf einem Block im Abstand von 3 mm voneinander befestigt sind, auf 3 mm zusammengequetscht. Der Block mit den Objektträgern wird auf einer Schiene mit einem Vorschub von 1, 7 cm/min an der Meßzelle vorbeigeschoben.
Vor den Objektträgern mit dem Gel befindet sich ein Spalt mit folgenden Abmessungen: 1 mm breit, 4 mm hoch, er befindet sich 1 cm vor der Photozelle. Da der Vorschub des Schreibers 2 cm/min beträgt, entspricht 1 cm auf dem Schreiberpapier 8, 5 mm Gel.

Gelsysteme

Die verwendeten Gele sind 7, 5 % an Acrylamid, werden andere Konzentrationen verwendet, so wird es eigens angegeben.

Benützte Abkürzungen :

Bis = N - N' Bismethylenacrylamid

Temed = N - N' Tetramethyläthylendiamin

Tris = Tris - Hydroxymethylaminomethan

Es werden zwei Systeme verwendet.

System A : (Diskelektrophorese)

Nach SHANDON ( 7 )

$P_H$ = 9, 5

a; Tris 36, 3 gr

1 N HCl 48 ml

Temed 0, 46 ml ad 100 ml bidest

b; Tris 5, 7 gr

1 N $H_3PO_4$ 25, 6 ml ad 100 ml bidest $P_H$ 6, 9

c; Acrylamid 30, 0 gr

Bis 0, 8 gr

$K_3$ Fe $(CN)_6$ 15 mg ad 100 ml bidest

d; Acrylamid 10, 0 gr

Bis 2, 5 gr ad 100 ml bidest

e; Riboflavin 4 mg ad 100 ml bidest

Das Untergel wurde folgendermaßen gemischt :

| Untergel A | Untergel B |
|---|---|
| 1 Teil a | Ammoniumperoxodisulfat |
| 2 Teile c | 0, 14 gr ad 100 bidest |
| 1 Teil bidest | |

Untergel A wird mit Untergel B im Verhältnis 1 : 1 gemischt, unter der Wasserstrahlpumpe evakuiert, in die 4 mm lichten Röhrchen, die mit Silikonfett ausgestrichen wurden, mit Hilfe einer Glasspritze gefüllt, 5 cm hoch, mit bidest überschichtet und unter eine UV - Lampe 1/2 Stunde polymerisiert.

Anschließend eine 1/4 Stunde auskühlen lassen.

Auf das Untergel wird folgendes Obergel aufgebracht :

1 Teil b

2 Teile d

1 Teil e

4 Teile Wasser

$P_H$ 6, 9

Hiervon werden 0, 1 ml aufgebracht. Es wird wieder mit bidest überschichtet und unter der UV - Lampe photopolymerisiert, bis eine milchige Trübung auftritt.

Als Elektrodenpuffer wird verwendet :

Glycin 28, 8 gr

Tris 6, 0 gr ad 1000 ml bidest

$P_H$ 8, 3

Dieser Puffer wird noch im Verhältnis 1 : 10 verdünnt.

Die Proteinprobe wird in einem Medium gelöst, das im Verhältnis 1 : 7 aus Puffer b und 50 % Saccharose besteht. Zur Elektrophorese wird diese Auftragslösung mit dem Elektrodenpuffer überschichtet. Stromstärke 3 mA pro Röhrchen.

System B : (Zonenelektrophorese)

Im Sauern mit Harnstoff nach TAKAYAMA et al. ( 8 )

Lösung A : Acrylamid 6 gr
Bis 0,16 gr
Harnstoff 12 gr
Eisessig 28 ml
mit Wasser wird auf 60 ml aufgefüllt.

Lösung B : Ammoniumperoxodisulfat 0,30 gr
Harnstoff 12 gr
mit Wasser wird auf 20 ml aufgefüllt.

Es werden gemischt Lösung A : Lösung B : Temed = 3 : 1 : 0,02
Das Gel ist dann 35 % an Essigsäure und 5M an Harnstoff.
Es wird evakuiert, mit Hilfe einer Glasspritze 5 cm hoch blasenfrei in die silikonbeschichteten Röhrchen eingefüllt und mit 75 % Essigsäure überschichtet, anschließend Polymerisation unter der UV - Lampe (1/2 Stunde, 1/4 Stunde auskühlen).
Elektrodenlösung : 10 % Essigsäure
Die Proteinprobe wird in Phenol : Essigsäure : Wasser wie 2 : 1 : 1 (Gewicht : Volumen : Volumen ) und 2 M an Harnstoff gelöst, im folgenden als Auftragslösung bezeichnet. Nachdem die Probe zur Elektrophorese aufgetragen ist, wird sie bis das Elektrophoreseröhrchen voll ist mit 75 % Essigsäure überschichtet. Darüber befindet sich die 10 % Essigsäure der Elektrodenlösung. Stromstärke 3 mA pro Röhrchen.
Nach der Elektrophorese wird um das Gel im Röhrchen Glyzerin als Gleitmittel eingespritzt, so daß es sich leicht zur Färbung herausziehen läßt.
Die Elektrophorese sowohl von System A, wie von System B wird bei + 3 Grad Celsius ausgeführt.

Vorteile der angewandten Methode :

Obwohl Elektrophorese eine der besten Methoden darstellt, um Ionen einer Mischung aufzutrennen, ist die Trennfähigkeit von verschiedenen elektrophoretischen Methoden doch sehr unterschiedlich.
Um zwei Komponenten zu trennen, ist es notwendig den Trennvorgang solange fortzusetzen, bis eine Ionenart wenigstens eine Strecke von der Höhe der Startzone weitergewandert ist, als die andere, d.h. aber je dünner die Startzone, um so schneller die

Trennung, um so geringer die Möglichkeit der Diffusion. Verbesserte Trennungen wurden erreicht, indem die Eigenschaft der Reibung von Molekülen in Gelen ausgenützt wurde (System A, System B). Dazu kommt bei der Diskelektrophorese in Gelen (System A) noch zum Vorteil die Porengröße wählen zu können, wie bei Polyacrylamid, der Vorteil, sehr dünne Startzonen zu erzielen, so daß schon in kurzen Läufen eine gute Trennung möglich ist.

KOHLRAUSCH ( 9 ) bemerkte, daß unter den Bedingungen seiner regulierenden Funktion die Trennlinie zwischen zwei verschiedenen Ionenlösungen im elektrischen Feld scharf erhalten blieb, wenn die Lösung mit den schnelleren Ionen unter die der langsameren kam (vorausgesetzt, daß beide in der gleichen Richtung wanderten). Beide Ionen einigen sich also gewissermaßen auf gleiche Geschwindigkeit.

Bei Konzentrationen, die unterschiedlich sind von denen, die von der Funktion vorgeschrieben werden, regulieren sie sich automatisch zu denen, die von ihr gefordert werden. Vorausgesetzt, daß die Konvektion, etwa durch Gele verhindert wird. Es bilden sich dann extrem dünne Startzonen, die genügend konzentriert sind, um das geforderte Verhältnis der Ionen im Gel (den schnelleren Ionen) zu, beispielsweise, den Proteinionen (den langsameren Ionen) zu erfüllen.

Als Beispiel kann man folgendes anführen, modifiziert nach ORNSTEIN ( 18 ).

Es ist :

$$\frac{A}{\Gamma} = \frac{x_\gamma \, c_\alpha}{x_\alpha \, c_\gamma} = \frac{m_\alpha \, z_\gamma \, (m_\gamma - m_\beta)}{m_\gamma \, z_\alpha \, (m_\alpha - m_\beta)}$$

$\alpha$, $\beta$ und $\gamma$ seien die verschiedenen Ionen, wobei $\beta$ die entgegengesetzte Ladung von $\alpha$ und $\gamma$ besitzen und sowohl in der Lösung, in der $\alpha$, wie in der, in der $\gamma$ enthalten ist, vorhanden sein soll.

c = Konzentration

m = elektrophoretische Beweglichkeit

x = Anteil der Dissoziation der Ionen

$\frac{A}{\Gamma}$ = Konzentration an $\alpha$ und $\gamma$, die vorhanden sein muß, umd die stabile Trennlinie während der Wanderung zu erreichen.

Es sei jetzt :

| | bei $P_H$ 8,3 | bei $P_H$ 8,3 |
|---|---|---|
| $\alpha$ = Albumin | $m_\alpha$ = - 6 Einheiten | $z_\alpha$ = - 30 |
| $\beta$ = Kaliumion | $m_\beta$ = + 37 " | $z_\beta$ = + 1 |

$\gamma$ = Chloridion $\quad m_\gamma = -37$ Einheiten $\quad z_\gamma = -1$

z = Ladung

Es ergibt sich dann für Albumin zu Chlorid ein Verhältnis von $9,3 \cdot 10^{-2}$. Das heißt aber, Albumin wird sich bis zu diesem Verhältnis konzentrieren und bildet dann nunmehr eine sehr dünne Scheibe, um die nötige Konzentration zu erreichen.
Man hat dann also die Vorteile der sehr dünnen, mit konzentrierten Startzonen verbunden. Bei einem Gemisch von Proteinen, werden sich die einzelnen Moleküle nach ihrer elektrophoretischen Beweglichkeit in Scheiben hintereinander ordnen.
Kommt dann im Verlauf der Elektrophorese die Trennlinie zwischen Chlorid und Protein ins Gel, so wird das Glycination (wenn etwa ein Glycinpuffer verwendet wird bei $P_H$ 8,3 ist die Beweglichkeit m = - 0,5, also langsamer als die Proteine) die Proteine überholen, da sie durch die Reibung im Gel stärker als das Glycination abgebremst werden. Die Bedingungen, um die Trennlinie zwischen Chlorid und Protein existieren also nicht mehr, die Proteine trennen sich wie in der Zonenelektrophorese weiter auf.
Die Vorteile der hier angewandten Arten der Elektrophorese liegen also neben der Ausnützung der Reibung in Gelen bei der Zonenelektrophorese (System B) in den sehr dünnen und konzentrierten Startzonen der Proteine (System A).

Färbemethoden :

Eiweißfärbung :

Zur Eiweißfärbung wird Amidoschwarz verwendet. Nachdem das Gel aus dem Röhrchen extrahiert wurde, wird es in weitere Röhrchen gebracht, die unten mit einem 1 cm hohen Gelpropf verschlossen sind. Dann werden die Röhrchen mit der Amidoschwarzlösung gefüllt: 550 mg Amidoschwarz/ 100 ml 7,5 % Essigsäure. Nach der Färbung, normalerweise 1 Stunde, wird die Farbstofflösung abgegossen, das Röhrchen mit dem Gel mit 7,5 % Essigsäure ausgespült und das nicht gebundene Amidoschwarz durch eine erneute Elektrophorese mit einer Stromstärke von 6 mA pro Röhrchen aus dem Gel gespült. Zum Entfärben wird als Elektrodenlösung 7,5 % Essigsäure verwendet.

Enzymfärbung:

Zur Anfärbung von enzymatisch aktiven Banden wurde die Methode von van der HELM

nach WIEME ( 10 ) (Nitroblautetrazoliummethode) modifiziert für die GDH angewandt.

Es wurden folgende Lösungen angesetzt:

a) 1M $\alpha$ - G P
b) DPN + 10 mg / ml
c) 0,1 M KCN
d) 0,005 M $Mg Cl_2$
e) Phosphatpuffer (0,5 M $P_H$ 7,4)
f) Nitroblautetrazolium 1 mg / ml
g) Phenazinmethosulfat 1 mg / ml

Diese Lösungen werden folgendermaßen gemischt:

Lösung a) 1 ml
b) 1 ml
c) 1 ml
d) 1 ml
e) 2,5 ml
f) 2,5 ml
g) 0,25 ml

In die frisch bereiteten Lösungen wird das Gel gegeben und 20 - 30 min im Wärmeschrank bei 37 Grad Celsius inkubiert. Die enzymaktiven Stellen zeigen sich als purpurne Streifen. Der Wasserstoff der Reaktion wird von $\alpha$ - GP auf $DPN^+$ übertragen, dann über Phenazinmethosulfat an das Nitroblautetrazolium übertragen, das im reduzierten Zustand als purpurnes Formazan ausfällt.
Es wurde bei den Versuchen beobachtet, daß verschiedene Chargen von NBT unterschiedliche Empfindlichkeit zeigten. Es wurde NBT von Firma Sigma verwendet.

Methoden mit denen GDH behandelt wurde :

Alkylierung mit Jodacetamid :

50 ul = 500 ug GDH werden abzentrifugiert, in 550 ul 8 M Harnstoff gelöst, mit 50 ul einer 0,1 M Lösung Jodacetamid (ungefähr 1000-facher Überschuß an Jodacetamid im Verhältnis zu den Thiolgruppen der GDH) versetzt, mit KOH auf $P_H$ 11, 4 eingestellt und 4 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wird die Lösung

eine halbe Stunde im Rotationsverdampfer eingeengt und mit 200 ul Eisessig angesäuert.

Reduktion mit Mercaptoäthanol :

500 ug GDH werden in 50 ul 8 M Harnstoff gelöst und 20 ul Mercaptoäthanol versetzt. 45 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Mit 50 ul Eisessig angesäuert.

Oxidation mit Perameisensäure :

100 ul = 1 mg GDH werden mit 25 ml Perameisensäure von 0 Grad Celsius versetzt, bei wechselnden Oxidationszeiten. Nach der Oxidation wird die Lösung im Rotationsverdampfer bis zur Trockne eingedampft. Das oxidierte Protein wird in 0, 5 ml 8 M Harnstoff und 0, 5 ml Eisessig gelöst.

Herstellung der Perameisensäure :

1 Teil 30 % Wasserstoffperoxid

9 Teile 98 % Ameisensäure

1 Stunde bei Raumtemperatur stehen lassen, dann auf 0 Grad abkühlen.

Kohlebehandlung der GDH : (nach ANKEL) ( 11 )

Herstellung der Aktivkohle :

20 gr Aktivkohle (Merck reinst) mit 3 x 100 ml bidest 10 min sieden, im Büchnertrichter absaugen, mit 100 ml 1 % EDTA waschen, dann mit 100 ml bidest waschen, in 30 ml Aether aufschlemmen bis zur Trockne absaugen, im Trockenschrank vom Aether befreien, in 200 ml 6 N HCl suspendieren, über Nacht unter Vakuum, im Büchnertrichter absaugen und bis zur neutralen Reaktion mit bidest waschen, im Trockenschrank trocknen, mit bidest zu einer 20 % Suspension aufschlemmen.
40 mg GDH = 4 ml werden 18 Stunden gegen 1 l bidest dialysiert bei 3 Grad Celsius. Das Ausgefallene wird abzentrifugiert. Der Überstand wird 10 min mit der Aktivkohle gerührt, die dann wieder abzentrifugiert wird. Dann $P_H$ auf 6, 3 einstellen, mit Ammonsulfat aufsalzen bis sich Kristalle bilden. Die Kristalle werden abzentrifugiert und in 3 ml 2, 7 M Ammonsulfat gelöst.

Ausbeute : 21 mg Protein. Aktivität vor der Behandlung 1950 BE / mg, nach der Behandlung 1900 BE / mg.

Enzymtest für die GDH nach BÜCHER - PETTE ( 12 )

TRAP 50 mM

EDTA 5 mM

DPNH 0,22 mM

Dihydroxyacetonphosphat 0,4 mM

$P_H$ = 7,6 t = 25 Grad Celsius

Es wird mit Dihydroxyacetonphosphat gestartet.

Eiweißbestimmung: (Biuretmethode) modifiziert nach BEISENHERZ et al. ( 13 )

Die Eiweißlösung nicht unter (o, 5 mg) wird mit 0,2 ml 5 % Trichloressigsäure versetzt, der Niederschlag wird abzentrifugiert der Überstand verworfen. Es wird zum Niederschlag 1 ml Biuretlösung gegeben. Rütteln bis sich der Niederschlag gelöst hat, dann mit 4 ml Biuretlösung verdünnen und 5 ml bidest zusetzen. Messen bei 546 mu und einer Schichtlänge der Küvette von 1 cm (E). E KCN der Lösung wird dann nach Entfärben durch KCN bestimmt. Die Menge Protein wird dann folgendermaßen berechnet:

( ( E - $E_{KCN}$ ) - Blindwert der Biuretlösung). 39 = mg Protein.

Die Biuretlösung wurde nach BEISENHERZ et al. hergestellt.

Herkunft der GDH :

Es wurde GDH - Boehringer verwendet.

Experimentelle Untersuchungen zur Methodik

Die Untersuchungen sollten dem Zweck dienen, eine einfache Methode zu finden, um Pherogramme auswerten zu können, an denen Eiweiß durch Amidoschwarz sichtbar gemacht wurde. Da Amidoschwarz zwei Sulfonsäuregruppen besitzt, muß sich im sauren Milieu eine Salzbildung zwischen den basischen Gruppen des Proteins und den Sulfonsäuregruppen des Farbstoffs ergeben. Die Aminogruppe im Amidoschwarzmolekül dürfte dabei im Sauern eine positive Ladung besitzen. Zum Nachweiss dieser Annahme führten GRASSMANN und HANNIG ( 14 ) folgenden Versuch aus. Sie bestimmten die Eichkurven für Albumin und Clupeinsulfat. Entsprechend seinem, durch den basischen Charakter bedingten, hohen Bindungsvermögen für sauren Farbstoff lieferte Clupeinsulfat etwa doppelt so hohe Extinktionswerte wie das Serumalbumin.
Ein Spektrum von Amidoschwarz in 7, 5 % Essigsäure ergab einen Hauptgipfel der Absorption bei 620 mu ( Abb. 2 ).

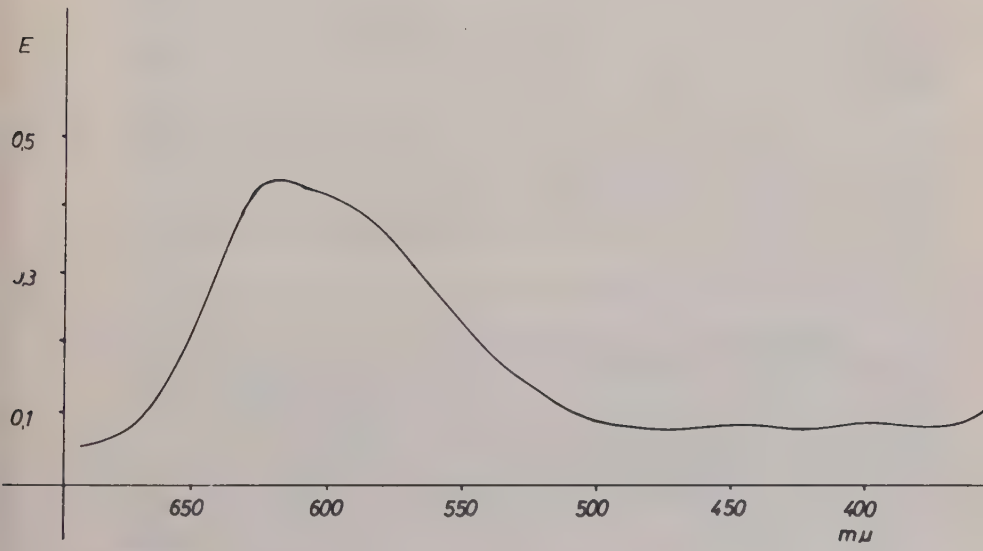



Abb. 2

Eine Messung bei der im Eppendorf-Photometer ein Filter von 578 mu verwandt wird, liegt also im aufsteigenden Teil dieses Maximums und dürfte somit eine gute spezifische Messbarkeit für Amidoschwarz ergeben.

Wie sollten nun die einzelnen Banden des Pherogramms ausgewertet werden? Grundsätzlich müßten dafür zwei verschiedene Methoden möglich sein. Einmal die direkte Auswertung, bei der der Gelstreifen direkt in den Lichtweg des Photometers gebracht wird und durch einen Vorschub die kontinuierliche Aufzeichnung der Extinktion ermöglicht wird, oder die zweite Art, daß der Farbstoff eluiert und die Extinktion in einer Küvette bestimmt wird. Hierbei gibt es wieder zwei verschiedene Möglichkeiten, einmal, daß man jede ganze Bande für sich aus dem Gel schneidet und eluiert, oder daß man in Serienschnitten das Gel in gleich große Teile schneidet und so der chromatographischen Technik ähnliche Ergebnisse bekommt. Dabei zeigt sich nun, daß die direkte Art der Auswertung durch Vorbeiziehen des Gels an der Photozelle für dicke Banden nicht mehr anwendbar ist, da praktisch keine Lichtdurchlässigkeit mehr vorhanden ist, man also eine unendliche Extinktion bekommt. Bei der Methode, bei der das Gel in Serienschnitte zerlegt wird, ist vor allem der Umstand von Nachteil, daß, etwa bei 1 mm Schnitten schwache Banden, die nicht allzuweit voneinander liegen nicht mehr als zwei, sondern nur mehr als eine erscheinen, während dicke Banden gut ausgewertet werden können. Vergleiche Abb. 7

Aus dem bisher Angeführten ergibt sich also, daß für schwache Banden die direkte, für starke dagegen die Methode der Serienschnitte von Vorteil ist. Finden sich aber auf einem Pherogramm sehr starke und sehr schwache Banden, so ergibt sich nur der Ausweg, daß man jede Bande für sich als ganzes Stück aus dem Gel schneidet und eluiert. Vergleiche Abb. 8.

Nun stellt sich aber die Frage womit das Amidoschwarz aus dem Gel eluiert werden kann. Hierfür fand sich eine 5 % Lösung eines Detergens, RBS 25 geeignet. (Vermutlich sind auch andere Detergentien für diesen Zweck zu gebrauchen). Je nach Farbstoffmenge im Gel ist eine Elutionszeit von einer bis drei Stunden im Rüttler erforderlich. Nach dieser Zeit hat sich der Farbstoff im ganzen ihm zur Verfügung gestellten Volumen gleichmäßig verteilt.

Um festzustellen, ob durch das Detergens der Farbstoff zerstört wird, wurde folgender Versuch unternommen :

Versuch 1 :

a) Eine Lösung von Amidoschwarz in 5 % RBS mit einer Extinktion der Lösung von E = 0, 298 wurde bei 32 Grad Celsius in ein Photometer gestellt und die Änderung der Extinktion bei 578 mu mit der Zeit registriert.

b) Eine Lösung von Amidoschwarz in 5 % RBS 25 mit einer Extinktion von E = 1, 04 wurde bei 32 Grad Celsius in einen Photometer gestellt und wiederum die Änderung der Extinktion mit der Zeit festgestellt. Nach 4 Stunden zeigte sich praktisch keine Änderung, bis auf eine leichte Erhöhung der Extinktion, die ja wohl kaum durch einen Zerfall des Farbstoffs bedingt sein kann, eher durch einen photometerbedingten Schleich.

Im nächsten Versuch soll die Extinktionszunahme bei steigenden Mengen Amidoschwarz in je 0, 5 ml 5 % RBS festgestellt werden.

Versuch 2 :

a) Es werden 5 mg Amidoschwarz in 25 ml RBS gelöst, von dieser Lösung werden 5 ul = 1 ug zu 0, 5 ml 5 % RBS gegeben, die Extinktion bestimmt und von ihr der Blindwert abgezogen. Von der gleichen Farblösung ( 5 mg / 25 ml ) werden 50 ul = 10 ug zu 0, 5 ml 5 % RBS gegeben und die Extinktion bestimmt.

b) 20 mg Amidoschwarz werden in 25 ml 5 % RBS gelöst, von dieser Lösung 5 ul = 4 ug, bzw. 20 ul = 16 ug zu je 0, 5 ml 5 % RBS gegeben und photometriert.

c) 30 mg Amidoschwarz werden in 25 ml 5 % RBS gelöst und von dieser Lösung 5 ul = 6 ug zu 0, 5 ml 5 % RBS gegeben und photometriert.

Abb. 3 zeigt diese Werte, daraus ergibt sich E/ug/ml/ = 0, 0505 in 5 % RBS 25 bei 578 mu.

Nun sollte untersucht werden, ob die Extinktion mit verlängerter Färbezeit bei gleichen Proteinmengen sich verändert.

Versuch 3 :

Es wird eine Lösung von 70 ug GDH / 10 ul hergestellt. Pro Röhrchen werden auf das Gel 10 ul aufgetragen. Laufzeit 60 min, Stromstärke 18 mA, Färbezeit 1/4 - 3 Stunden. 2 Stunden bei 6 mA/Röhrchen entfärbt. 3 Stunden im Rüttler in 1 ml 5 % RBS eluiert. Es wurde Gelsystem B verwendet.

Abb. 4 zeigt die Zunahme der Extinktion mit der Färbezeit.

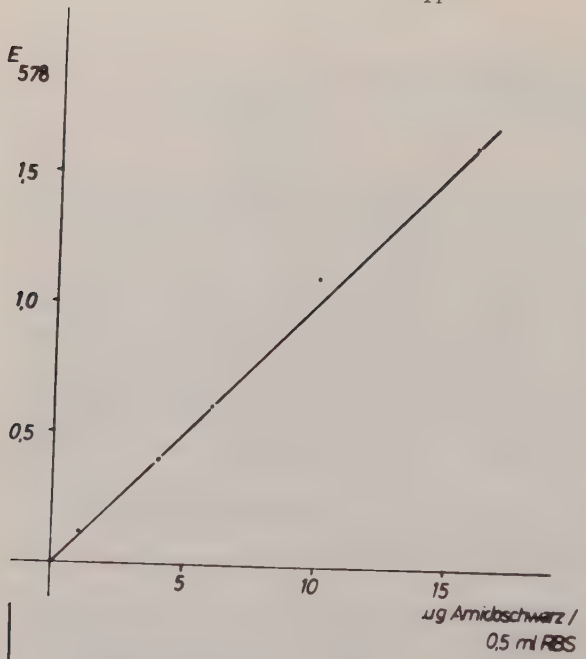
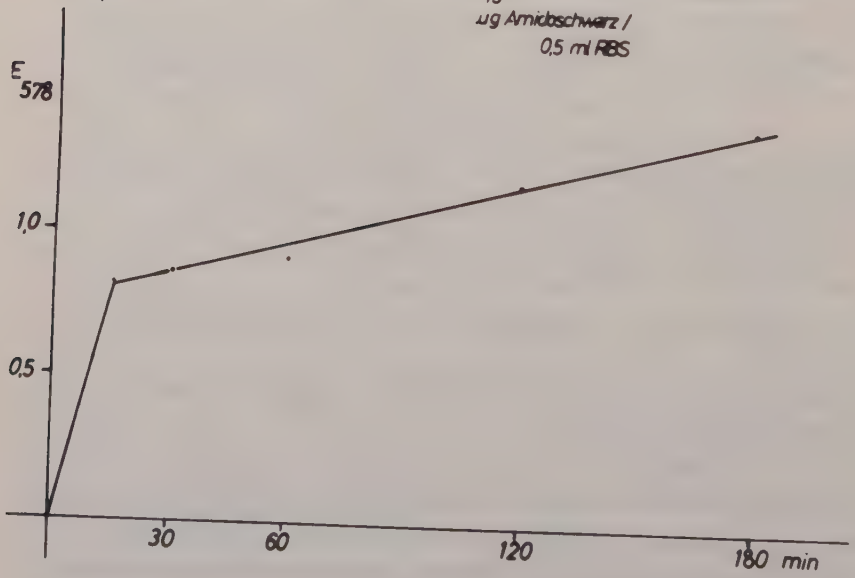



Abb. 3 : Die Punkte stellen Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dar.

Abb. 4 : Die Punkte stellen Mittelwerte aus Zweifachbestimmungen dar.




Das Gelvolumen wurde nicht zusätzlich zu 1 ml Elutionsvolumen berücksichtigt.

Der in Abb. 4 dargestellte Befund läßt sich vermutlich dadurch erklären, daß das Amidoschwarzmolekül im Sauern neben zwei negativen auch eine positiv geladene Gruppe besitzt, so daß an das Amidoschwarzmolekül, das am Proteinmolekül hängt, sich ein weiteres Amidoschwarzmolekül hängen kann usw., so daß es zu einer fortdauernden Färbung kommt. Die Kurve in Abb. 4 sieht außerdem so aus, als ließe sie sich auf eine Färbezeit von 0 min extrapolieren, daß also die extrapolierte Extinktion von Amidoschwarz der Anzahl der basischen Gruppen im Proteinmolekül äquivalent ist. Dies müßte tatsächlich der Fall sein, wenn sich jedes Amidoschwarzmolekül nur mit einer basischen Gruppe des Proteinmoleküls verbinden könnte. Da aber pro Amidoschwarzmolekül zwei saure Gruppen vorhanden sind, läßt sich diese Annahme nicht sichern.

Berechnet man die Bindungskapazität der GDH für Amidoschwarz, wobei der auf 0 min extrapolierte Wert zu Grunde gelegt wird : für 70 ug GDH ergibt sich eine Extinktion bei 0 min von E = 0,75. Die Extinktion von 0,75 entspricht 15 ug Amidoschwarz = 26 Nanomol. 70 ug GDH entsprechen 0,9 Nanomol. Pro mg Protein werden also 0,214 mg Amidoschwarz gebunden. Es ergibt sich dann eine Bindungskapazität der GDH von 27,7 Mol Amidoschwarz pro Mol GDH.

Nimmt man eine Verbindung von einem Molekül Amidoschwarz mit einer basischen Gruppe des Proteins an, so müßten also 27,7 Mol basischer Gruppen pro Mol GDH vorliegen. Würden pro Molekül Amidoschwarz 2 freie basische Gruppen gebunden, so würden sich 55,4 Mol basischer Gruppen pro Mol GDH ergeben. In der Arbeit von van EYS et al. ( 15 ) finden sich für Lys, Arg und His für ein Molekulargewicht von 76 - bzw. 78 000 94 basische Aminosäuren. Es müßten daher nicht alle basischen Gruppen für Amidoschwarz zugänglich sein, da sie ja signifikant unter dem von van EYS et al. angeführten Wert liegen.

So mag diese Methode vielleicht geeignet sein, in einem Gemisch von Proteinen die durch Elektrophorese getrennt wurden, die verschiedenen basischen Gruppen abzuschätzen, also wie sich diese Gruppen der einzelnen Proteine zueinander verhalten. Zu einer genauen Bestimmung der basischen Gruppen dürfte sie aber keineswegs genügen.

Im Versuch 4 soll eine Eichkurve hergestellt werden. Es werden steigende Mengen GDH aufgetragen und die Extinktion von Amidoschwarz nach gleicher Färbe-, Entfärbe- und Elutionszeit bestimmt.

Versuch 4 :

Für die Versuche im unteren ug Bereich werden 400 ul GDH einer Suspension von 10 mg / ml abzentrifugiert und in 200 ul bidest gelöst. Von dieser Proteinlösung wird die genaue Proteinkonzentration in Doppelbestimmungen mit der Biuretmethode festgestellt. Je 20 ul dieser wässrigen Proteinlösung werden mit steigenden Volumina der Auftragslösung versetzt und wieder gelöst.

Ebenso wurde bei den Versuchen im oberen ug Bereich (ab 100 ug) verfahren, nur daß hier 800 ug GDH der Lösung von 10 mg / ml abzentrifugiert und in 200 ul bidest gelöst wurde. Auch hier wurde anschließend der Biuretwert bestimmt. Je 20 ul dieser wässrigen Proteinlösung wurden mit steigenden Mengen Auftragslösung verdünnt. Von dieser Verdünnungsreihe wurden pro Röhrchen 50 ul, mit Ausnahme der Werte über 200 ug, bei denen 70 ul eingesetzt wurde, aufgetragen. Nach einer Laufzeit von 60 min und einer Stromstärke von 18 mA wurden die Gele eine Stunde angefärbt, 2 Stunden elektrophoretisch bei 6 mA pro Röhrchen entfärbt und dann während 3 Stunden Rüttelns in je 1 ml 5 % RBS eluiert. Es wurde Gelsystem B verwendet.

Von den gemessenen Werten wurde noch der Blindwert der RBS-Lösung subtrahiert. Das zu dem 1 ml RBS kommende Gelvolumen von ungefähr 70 ul wurde in der folgenden Abb. nicht berücksichtigt. Wie aus der Abb. 5 ersichtlich kommt es zu keinem linearen Anstieg der $E_{578}$ von Amidoschwarz mit steigenden Mengen GDH. Die Kurve kann durch folgende Gleichung beschrieben werden :

$$E = 2 \, (1 - e^{-0,0095 \, ug})$$

| ug | E | ug | E |
|---|---|---|---|
| 10 = | 0,180 | 100 = | 1,225 |
| 20 = | 0,350 | 130 = | 1,415 |
| 30 = | 0,500 | 150 = | 1,520 |
| 40 = | 0,630 | 200 = | 1,700 |
| 80 = | 1,065 | 250 = | 1,810 |

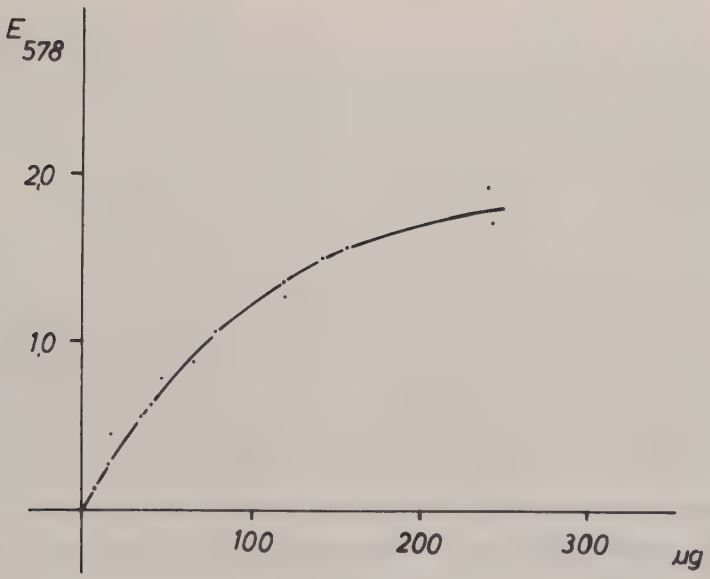



Abb. 5 : Ergebnis von Versuch 4.

Die aus der oben angeführten Formel berechneten Werte entsprechen genau dem experimentellen Befund.
Aus dieser Gleichung kann man entnehmen, daß für eine unendliche Proteinmenge die Extinktion E = 2 ist. Die Kurve wird sich also asymptotisch diesem Endwert nähern. Aus welchen Bestandteilen sich die Konstante mit dem Wert von K = 0,0095 zusammensetzt, kann aus dem vorliegenden Material nicht ausgesagt werden. Vermutlich müßten Versuche mit anderen Proteinen unternommen werden, um diese Konstante näher untersuchen zu können.

Da die Werte der gemessenen Eichkurve für GDH auf einer genau definierbaren Kurve liegen, muß es also auch möglich sein, aus der Extinktion auf eine unbekannte Proteinmenge zu schließen. Besonders günstig scheint hierfür der Bereich von 10 - 100 mg Protein zu liegen, da hier die Kurve am steilsten ansteigt. Bei Verminderung des Elutionsvolumens ist es wahrscheinlich noch möglich die Proteinmengen in noch kleinere Bereiche zu verschieben. Man kann also mit dieser Methode noch Protein-

mengen erfassen, für die die Biuretbestimmung keine sicheren Werte mehr ergibt. Übrigens finden GRASSMANN und HANNIG ( 14 ) für Albumin und Gamma - Globulin ebenfalls einen nichtlinearen Anstieg der Extinktion mit steigenden Proteinmengen, wobei in ähnlicher Weise wie hier die Kurve zunächst stärker ansteigt, dann aber der Anstieg langsamer wird (diese Werte wurden direkt nach der Papierelektrophorese ausphotometriert). Während URIEL ( 16 ) bei der Geleelektrophorese für menschliches Albumin, Transferrin und Gammaglobulin einen linearen Anstieg fand (im Bereich von 1 : 10). Bemerkenswerter Weise fanden GRASSMANN und HANNIG einen Unterschied zu den Eichkurven, die direkt ausphotometriert wurden, wenn sie den Farbstoff mit n/20 NaOH eluierten und dann die Extinktion bestimmten, denn bei der Methode zeigt sich ein größerer Unterschied in den Eichkurven für Albumin und Gammaglobulin als beim direkten Auswerten. Die Kurven liegen also weiter auseinander. Sie konnten sich außerdem überzeugen, daß die Elution des Farbstoffs vollständig war und die Zerstörung des Farbstoffs im Alkalischen erst nach vielen Stunden einen meßbaren Wert ausmachte. Daraus schlossen sie, daß das Ergebnis der Elutionsversuche der wirklichen Farbstoffbindung an das Protein entspricht.

## EXPERIMENTELLER TEIL

Bei den folgenden Versuchen wurde davon ausgegangen, Beweismaterial für die Möglichkeit der Existenz von Isoenzymen der GDH zu sammeln, die ja nur bei Vorliegen von frei kombinierbaren Untereinheiten des Proteinmoleküls vorkommen können. 1960 übrigens konnte TSAO ( 17 ) in der Niere der Ratte zwei Isoenzyme der GDH auf elektrophoretischem Wege feststellen und 1964 konnten van EYS et al. ( 15 ) Hinweise für das Vorhandensein von zwei verschiedenen Untereinheiten finden. Da die Untereinheiten des Proteins durch Wasserstoffbrückenbindungen zusammen gehalten werden, liegt der Gedanke nahe, durch hohe Konzentrationen an Harnstoff diese Intramolekularen Bindungen durch den Überschuß an Harnstoff abzusättigen, so daß diese Brücken zwischen den Untereinheiten nicht mehr wirksam werden können und sie so eine Trennung der verschiedenen Eiweißstrukturen zulassen.

### Versuche im Alkalischen

In diesen Vorversuchen wurde das Enzym bei einem $P_H$ von 9, 5 der Elektrophorese unterworfen, bei dem es noch nicht denaturiert, sondern seine Aktivität noch erhalten ist. Als Elektrophoresesystem wurde System A benützt.

Vorversuch 1 :

40 ul einer Kristallsuspension von 10 mg Protein/ml, entsprechend 400 ug GDH werden abzentrifugiert, mit 140 ul 50 % Saccharose und 20 ul eines Puffers von $P_H$ 6, 9 versetzt, der auf 100 ml aufgefüllt 5, 7 g Tris und 25, 6 ml 1 N $H_3PO_4$ enthält. Die Kristalle werden hierin gelöst und je 20 ul gleich 50 ul Protein in dieser Lösung pro Röhrchen aufgetragen. Laufzeit 75 min, Stromstärke 18 mA.

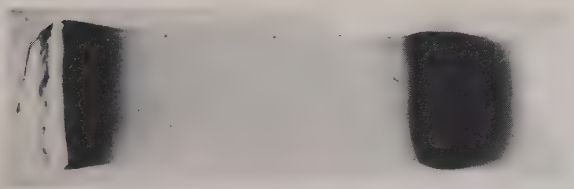


Abb. 6 : Die Abb. zeigt das Ergebnis von Vorversuch 1

Das Protein, das an der Auftragsstelle in Abb. 6 liegengeblieben ist, läßt sich mit längerer Laufzeit ebenfalls in die kleinen Banden auflösen. Die Frage, wo bei dieser komplizierten Streifenverteilung eigentlich die Enzymaktivität sitzt, wurde in Vorversuch 2 untersucht.

Vorversuch 2 :

20 ul = 200 ug Protein werden abzentrifugiert, mit 70 ul 50 % Saccharose und 10 ul des Puffers wie im vorigen Versuch versetzt. Je 40 ul dieser Lösung, entsprechend 100 ug Protein werden aufgetragen (es wurde hier im Vergleich zum vorherigen Versuch eine größere Proteinmenge eingesetzt, um die GDH aktive Bande deutlicher werden zu lassen). Laufzeit 75 min, Stromstärke 18 mA. Anschließend Enzymfärbung, dabei zeigt sich, daß nur die erste große Bande der Eiweißfärbung enzymatische Aktivität zeigt. Die vielen kleinen Banden treten nicht mehr auf.
Wie diese kleinen Streifen entstehen und was sie darstellen, konnte nicht geklärt werden.

Versuche im Sauern mit 5 M Harnstoff

Alle weiteren Versuche wurden im Sauern mit 5 M Harnstoff durchgeführt, um etwa vorhandene Untereinheiten voneinander abtrennen zu können. Es wurde System B verwendet.

Versuch 1 :

Es werden 160 ul einer Kristallsuspension von GDH mit einer Proteinkonzentration von 10 mg/ml abzentrifugiert, in 160 ul einer Lösung Phenol : Eisessig : Wasser wie 2 : 1 : 1 (Gw. : Vol. : Vol.) und 2 M an Harnstoff gelöst und mit Hilfe einer Pipette 25 ul = 250 ug pro Röhrchen aufgetragen. Nach einer Laufzeit von 60 min und einer Stromstärke von 18 mA zeigt sich nach einstündigem Färben und elektrophoretischem Entfärben eine in ihrer Stärke abnehmende Bandenzahl.
(Da eine Elution mm für mm des Gels auch bei einer Laufzeit von zwei Stunden durch die schwachen letzten Banden kein befriedigendes Bild ergibt, wie Abb. 7 zeigt, werden die Banden für sich herausgeschnitten und eluiert. Abb. 8.

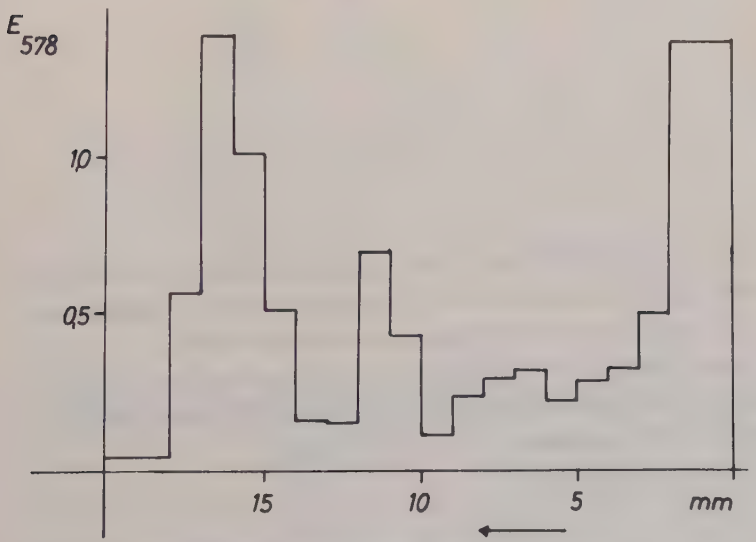



Abb. 7 : Der Pfeil gibt die Laufrichtung an. mm Serienschnitte.

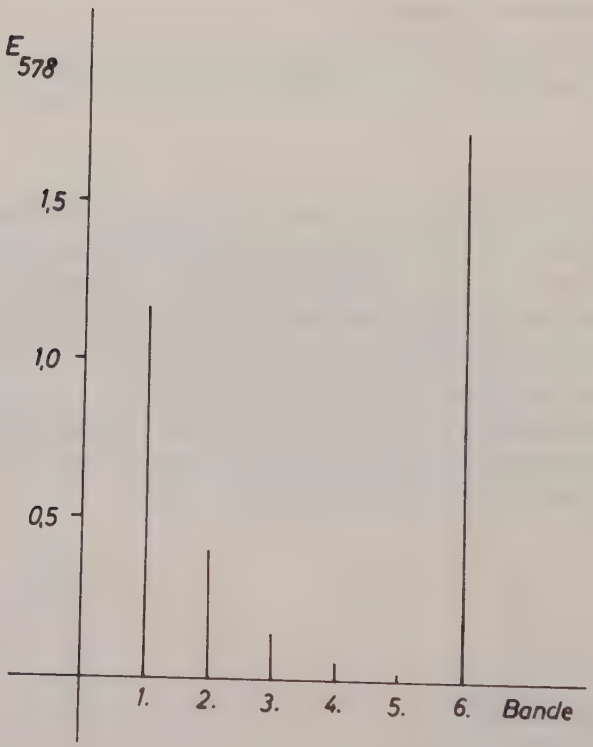



Abb. 8 : Hier ist die Extinktion bei 578 mu von jeder diskreten Bande aufgetragen, nach Elution. Die 6. Bande entspricht dem an der Auftragsstelle liegengebliebenen Protein. Die erste Bande entspricht dem am schnellsten wandernden Teil.
Trägt man den gleichen Befund auf einfach-logarithmisches Papier auf. so liegen die einzelnen Punkte auf einer Geraden, d.h. die gemessenen, diskreten Werte müssen auf einer Kurve der Funktion $y = a \cdot e^{-bx}$ liegen.
Abb. 9 zeigt diese Darstellung.

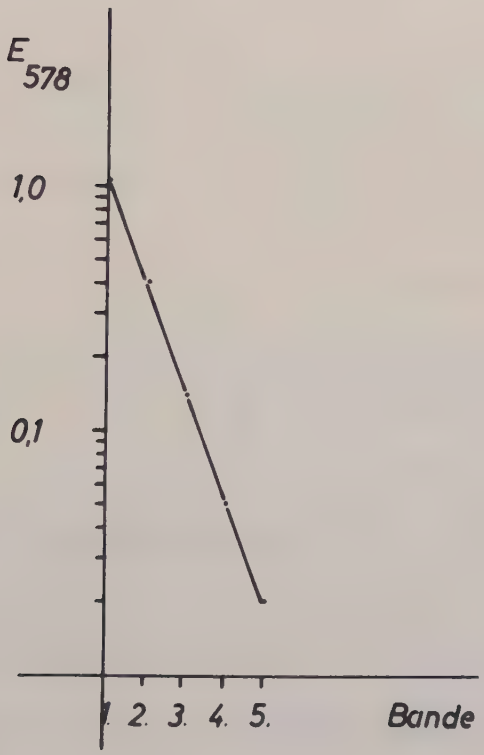



Abb. 9 :

Betrachtet man weiterhin die Geschwindigkeitsverteilung der einzelnen Banden so findet man Abb. 10

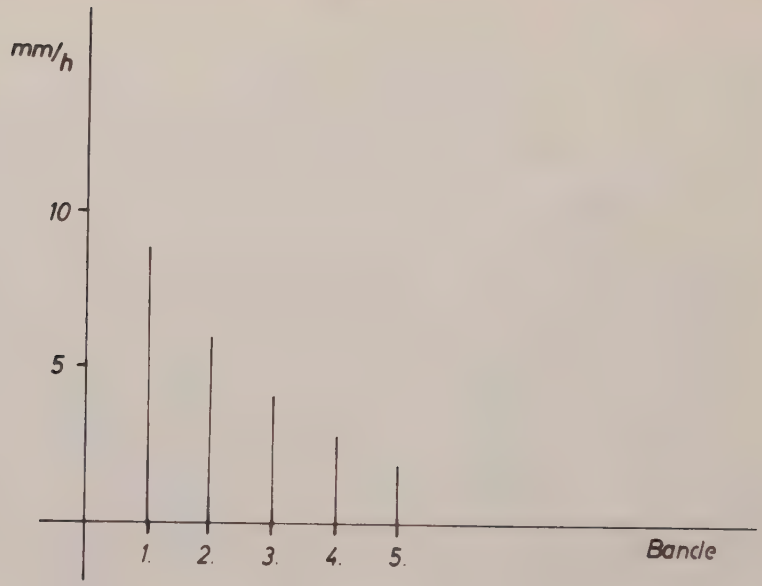



Abb. 10 :

Versuch 2 :

Es werden 80 ul = 800 ug der GDH Kristallsuspension abzentrifugiert, mit 80 ul der Auftragslösung versetzt und 1 x 25 ul = 250 ug, dann 5 ul = 50 ug und 5 ul ( 1 : 1 verdünnt) = 25 ug pro Röhrchen aufgetragen. Nach einer Laufzeit von 60 min zeigt sich die Verteilung wie im Versuch 1, bei 120 min und 18 mA spaltet sich die am schnellsten wandernde Bande in 2 auf.

Dies ist am besten bei den Gelen zu sehen, auf die 25 bzw. 50 ug aufgetragen wurde. Abb. 11 zeigt den Befund.

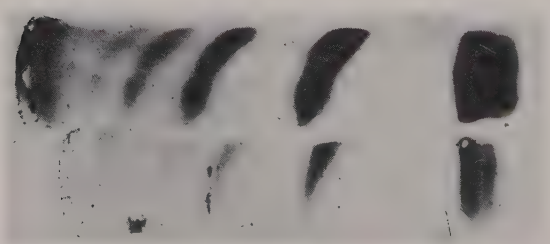


Abb. 11

Um die Wirkung einer Dialyse des Proteins auf die Bandenverteilung zu sehen, wird folgender Versuch unternommen.

Versuch 3 :

200 ul = 2 mg GDH werden 18 Stunden gegen 1 l bidest dialysiert. Nach der Dialyse finden sich in 200 ul Dialysat 1, 5 mg gelöstes Protein. Zu diesen 200 ul Proteinlösung werden 600 mg Phenol, 300 ul Eisessig und 144 mg Harnstoff gegeben und gelöst. Von diesen annähernd 1100 ul Lösung werden

180 ul = 250 ug
30 ul = 50 ug
15 ul = 25 ug aufgetragen.

Laufzeit 120 min bei einer Stromstärke von 18 mA.
Es zeigt sich der gleiche Effekt wie im vorhergehenden Versuch: Eine Aufspaltung der am schnellsten wandernden Bande in zwei. Die langsameren Streifen sind wieder vorhanden.

Im nächsten Versuch soll die Wirkung des Gefrierens und Wiederauftauens auf die Kristallsuspension untersucht werden, in Anlehnung an die Möglichkeit der Hybridisation bei der Lactatdehydrogenase.

Versuch 4 :

40 ul = 400 ug GDH werden 3 x eingefroren und wieder aufgetaut, dann über Nacht im Kühlschrank belassen. Davon werden dann 20 ul abzentrifugiert, in 40 ul Auftragslösung gelöst. Hiervon 10 ul = 50 ug aufgetragen. Laufzeit 120 min, Stromstärke 18 mA. Es spaltet sich wieder die am schnellsten wandernde Bande in zwei auf. Sie erscheinen aber weniger klar wie im Versuch 2.

Versuch einer Erklärung des Befundes im Sauern mit 5 M Harnstoff

Die Frage war, wie diese Banden gedeutet werden könnten. So entwickelte sich der Gedanke, daß die einzelnen Banden Aggregate, also Vielfache des einzelnen Proteinmoleküls darstellen. Zum Beweis dieser Annahme können theoretische und experimentelle Befunde angeführt werden.
Stellt man sich zunächst eine Aggregatreihe vor, bei der die Vervielfachnungen vorkommen : A, $A_2$, $A_4$, $A_8$, $A_{16}$ usw., so muß diese Art der Aggregation unwahrschein-

lich erschienen, da in den oben angeführten Versuchen 7,5 % Gel (an Acrylamid) verwandt wurde, das nach ORNSTEIN ( 18 ) einer Porenweite von 50 Angstöm entspricht. Die 50 A liegen etwa in der Größenordnung von Molekülen mit einem Molekulargewicht von 300 000 - 400 000. Bei 5 Banden, entsprechend einer Aggregation von $A_{16}$ errechnet sich aber für die GDH bei einem Molekulargewicht von 78 000, ein Molekulargewicht für $A_{16}$ von 1.250 000. Diese Moleküle wären also weit oberhalb der Ausschlußgrenze des Gels. Nimmt man aber eine Reihe von A, $A_2$, $A_3$, $A_4$, $A_5$, usw. an, so liegt das Molekulargewicht von $A_5$ bei 390 000 bei einer Reihe von $A_{1/2}$ A, $A_2$, $A_3$, $A_4$, usw. für $A_4$ bei 312 000. Diese Werte liegen aber im Bereich der Größenordnung der Poren, so daß diese Reihen wahrscheinlicher erscheinen und für die folgenden Untersuchungen angenommen werden können. Im besonderen gilt das für die Reihe $A_{1/2}$, A, $A_2$, usw. die mit dem Molekulargewicht für $A_4$ von 312 000 sehr nahe an dem Wert von 300 000 für 7,5 % Gel liegt nach SHANDON ( 7 ). Zunächst stellt sich noch das Problem, ob die Gleichgewichtskonstante für die Bildung der verschiedenen Aggregate gleich ist. Dazu kann man anführen, daß auch das Verhältnis der Extinktion der einzelnen Banden zueinander gleich ist, wie ja auch die Auftragung auf einfach-logarithmischem Papier zeigt. Da aber K nur auf dem Verhältnis der Reaktionspartner zueinander beruht, das Verhältnis aber immer gleich ist, darf man wohl ein gleiches K für alle Werte annehmen. In der folgenden Ableitung wird bewußt die Zahl der möglichen Reaktionen auf nur eine Art eingeschränkt, bei der zur Bildung eines größeren Komplexes zum kleineren nur immer ein Molekül hinzutreten soll. Die Ableitung wird sowohl für die Reihe A, $A_2$, $A_3$, $A_4$, usw. und für $A_{1/2}$, A, $A_2$, $A_3$, usw. zutreffen, da es sich bei beiden um fortlaufende Reihen handelt.

Es ist also :

$$A + A \rightleftharpoons A_2 \qquad K = \frac{A_2}{A^2} \qquad A_2 = K A^2$$

$$A_2 + A \rightleftharpoons A_3 \qquad K = \frac{A_3}{A_2 \; A} \qquad A_3 = K A_2 A$$

$$A_3 + A \rightleftharpoons A_4 \qquad K = \frac{A_4}{A_3 \; A} \qquad A_4 = K A_3 A$$

usw.

Die Gesamtsumme aller Aggregate wird nungleich 1 gesetzt.

$$A + A_2 + A_3 + A_4 \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots + A_n = 1$$

oder durch K und A ausgedrückt :

$$A + K A^2 + K^2 A^3 + K^3 A^4 \ldots\ldots\ldots\ldots\ldots + K^{(n-1)} A^n = 1$$

Die Gleichung wird mit K multipliziert und ergibt dann :

$$K A + K^2 A^2 + K^3 A^3 + K^4 A^4 \ldots\ldots\ldots\ldots + K^n A^n = K$$

Die Summe dieser unendlichen geometrischen Reihe ist aber:

$$\frac{1}{1 - K A} - 1 = K$$

daraus ergibt sich für A :

$$\frac{1}{1 - K A} = K + 1$$

$$1 = (K + 1)(1 - KA)$$

$$1 = K + 1 - K^2 A - KA$$

$$K = A (K^2 + K)$$

$$A = \frac{K}{K^2 + K}$$

$$A = \frac{1}{K + 1}$$

In dieser Gleichung ist A in die Abhängigkeit von K gebracht und es ergeben sich somit für die Aggregate folgende Werte :

K = 1/3 (annähernd dem experimentellen Befund von K = 0,37)

$A_1 = 0,75$

$A_2 = 0,18$

$A_3 = 0,04$

$A_4 = 0,01$

$A_5 = 0,002$

Für K = 1/2 entstehen die Werte :

$A_1 = 0,66$

$A_2 = 0,22$

$A_3 = 0,07$

$A_4 = 0,024$

$A_5 = 0,0082$

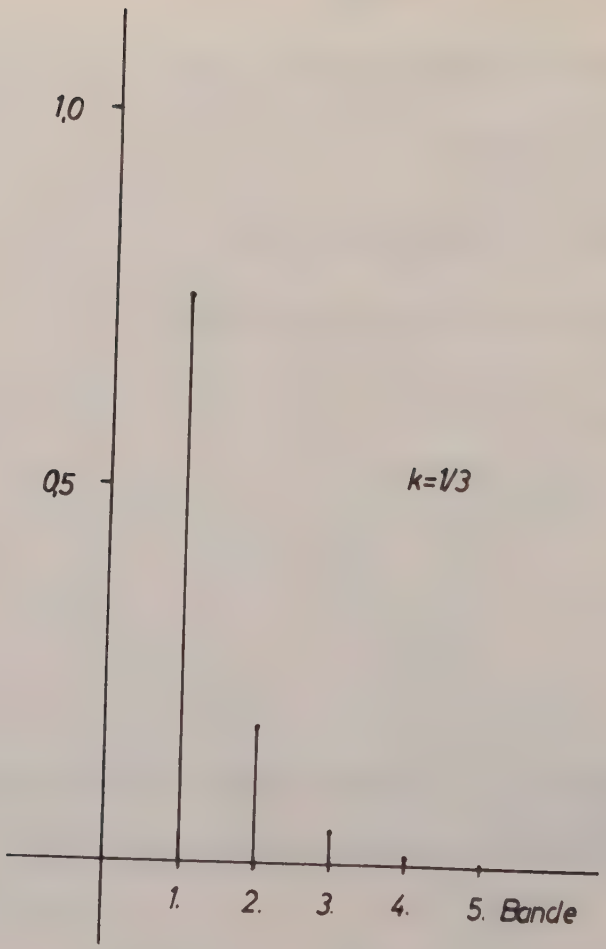



Abb. 11 : zeigt des Befund K = 1/3

In Abb. 12 sind die Werte K = 1/3 und K = 1/2 auf die Extinktion übertragen, indem 0,75 bzw. 0,66 gleich E = 1,140 gesetzt wird (die Extinktion von 1,140 entspricht dem Wert der ersten Bande von Versuch 1 ) und die anderen Werte im entsprechenden Verhältnis berechnet werden.

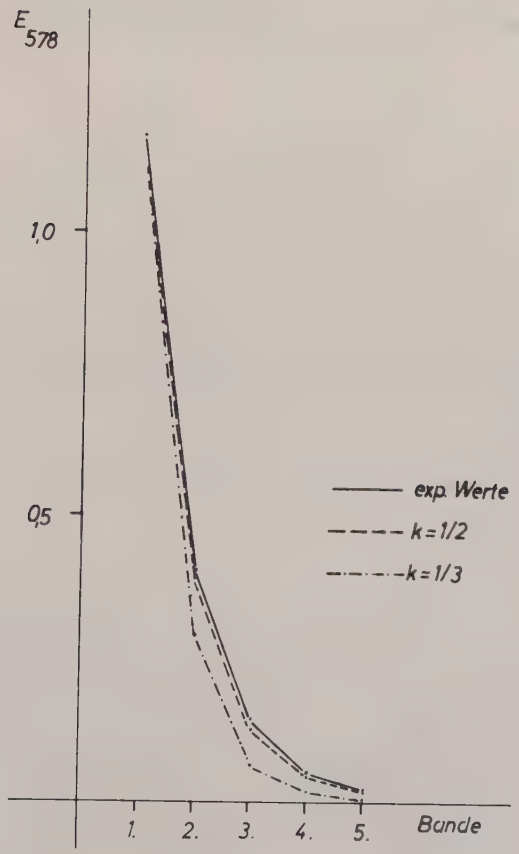



Abb. 12 :

Wie man aus Abb. 12 entnehmen kann, entsprechen die Werte für K = 1/2 ziemlich genau dem experimentellen Befund, während die theoretischen Werte für K = 1/3 niedriger liegen. Diese Diskrepanz zwischen experimentellen und theoretischen Werten läßt sich vermutlich dadurch erklären, daß ja in Wirklichkeit die Aggregate noch auf andere Weise als der hier angenommenen zustande kommen können. Ihre Werte also höher liegen müssen. Aber doch läßt sich sagen, daß die hier angenommene Art der Aggregatbildung einen bedeutenden Teil der möglichen Reaktionsarten ausmachen muß.

Auch die liegengebliebene Menge des Protein läßt sich zur Bestätigung der Aggregatbildung heranziehen, da ja nur Teilchen, die größer sind als die Poren nicht ins Gel eindringen können.

A seien Teilchen die $<$ Poren

B " " " $>$ "

P sei die Anzahl der Poren im Querschnitt der Auftragsstelle.

Es wird also solange Protein ins Gel eindringen können, bis n B Teilchen P Poren verstopft haben. Da aber P $<$ n B sein wird, werden an der Auftragsstelle A Teilchen zurückgehalten werden müssen. Auf Grund der Teilchen B, die aus den Teilchen A entstanden sein müssen, da ja nur eine Molekülart aufgetragen wird, ist also das liegengebliebene Protein zu erklären und ergibt hiermit einen weiteren Hinweis für die Aggregation.

Zur experimentellen Stützung der Annahme der Aggregatbildung wird folgender Versuch unternommen :

Versuch 5 :

200 ul = 2 mg GDH werden abzentrifugiert und in 200 ul Auftragslösung gelöst, hiervon werden je 25 ul = 250 ug aufgetragen. Laufzeit 80 min, Stromstärke 18 mA. Es wurde 7,5 bis 15 % Gel an Acrylamid verwandt, dabei zeigt sich, daß mit steigender Geldichte, die am langsamsten wandernden Banden ausgeschlossen werden, sie also Aggregate mit steigender Größe darstellen müssen.

| | |
|---|---|
| 7,5 % | 5 - 6 Banden |
| 8 % | 3 - 4 " |
| 9 % | 1 - 2 " |
| 9,5 % | 1 " |
| 10 % | 1 " |
| 12,5 % | 1 " |

Es scheint sich also tatsächlich um eine Aggregatbildung zu handeln.

Wie kann man aber erklären, daß die Aggregate mit Hilfe der Elektrophorese überhaupt getrennt werden können.

Stellt man sich nämlich die Geschwindigkeit eines Moleküls als $v \text{ prop } \frac{E \; Q}{R}$ vor,

v : Geschwindigkeit

E : elektrische Feldstärke

Q : Ladung des Moleküls

R : Reibung

so müßte sich rein theoretisch bei einer Aggregation die Ladung verdoppeln, anderseits aber auch wieder die Reibung (unter Berücksichtigung des Adam - Stokesschen - Gesetzes $R = 6\pi\eta \; r \; . \; v$). Da sich ja der Radius r ebenfalls verdoppelt. Die Geschwindigkeit alle Aggregate müßte gleich sein, es dürfte sich also nur eine Bande zeigen.

ORNSTEIN ( 18 ) führt an : "Ein Teilchen, das sich durch ein Gel bewegt, bedingt eine Reibung, die eine komplexe Funktion von r, dem Radius des Teilchens darstellt. Die Viskosität des Gels ist niedrig wenn 2 r klein ist, verglichen mit der durchschnittlichen Porengröße des Gels, und ist unendlich, wenn 2 r sehr groß ist im Verhältnis zur Porenweite". Ist aber das Molekül in der gleichen Größenordnung wie die Poren des Gels, so ist es fähig auf Grund seiner kinetischen Energie die Poren zu dehnen und hindurchzuschlüpfen. Das Adam-Stockessche-Gesetz kann also nicht mehr gültig sein, da es ja das Verhalten großer Körper zu sehr kleinen beschreibt, etwa einer Stahlkugel zu Wassermolekülen. So daß also für ein Teilchen, dessen Radius nochmal so groß ist wie der eines zweiten, ein größerer Widerstand an den Poren zu überwinden ist, als zwei R, wenn R den Widerstand des zweiten Teilchens an den Poren darstellen soll, da es ja neben dem Widerstand des Wassers auch noch im steigendem Maß den Widerstand des Polyacrylamidnetzes zu überwinden hat. So daß also die Reibung, etwa eines Dimeren größer ist wie die doppelte Reibung des Monomeren. Außerdem führt ORNSTEIN ( 18 ) an, daß die elektrophoretische Beweglichkeit m von einem Formfaktor X abhängt.

Wobei :

$$m = \frac{d}{t \; . \; V} = \frac{Q \; X}{f}$$

d = zurückgelegter Weg des Ions in der Zeit t

V = Spannungsgradient

f = Reibungswiderstand des Mediums

Q = Ladung des Ions

X = dimensionsloser Faktor, der die effektive Ladung des Ions ändert und von den umgebenen Ionen und seiner Größe abhängt (des Ions).

X = definiert als (aus ORNSTEIN nach GORIN) ( 18 )

$$X = \frac{(1 + W \cdot r_b) \cdot f(Wr)}{1 + W(r + r_b)}$$

$$W = (8\pi E^2 J / C K T)^{1/2}$$

$$J = \frac{1}{2}\sum C_i z_i$$

r = Radius des Teilchens (Protein)

$r_b$ = Radius des Pufferions

$c_i$ = Konzentration des $i^{ten}$ Ions

$z_i$ = Ladung des $i^{ten}$ Ions

E = Ladung des Elektrons

C = Dielektrizitätskonstante des Mediums

K = Boltzmannkonstante

T = absolute Temperatur

f (Wr) ist eine Funktion die von HENRY ( 19 ) tabuliert wurde.

$\frac{1}{W}$ = Dicke der Debye - Hückel Doppelschicht, die ein geladenes Teilchen in einem ionischen Medium umgibt.

W . r ist dann der Bruch des Radius des Teilchens zu dieser Dicke.

Aus den Kurven, die ORNSTEIN nach der obigen Gleichung anführt, kann man entnehmen, daß für Molekül A, das größer ist wie ein Molekül B, aber die gleiche Ladung besitzt, bei gleicher Ionenstärke der Umgebung, X kleiner ist für A wie für B. So daß also die elektrophoretische Beweglichkeit von Molekül A auch kleiner wird wie für Molekül B. Wie man sieht, läßt sich die Auftrennung der Aggregate im Gel also durch veränderte Reibung und veränderte elektrophoretische Beweglichkeit der Aggregate erklären.

Versuche zur Ursache der Aggregation

Es drängt sich also die Frage auf, auf Grund welcher Ursache die Aggregation zustande kommen kann. Dazu wurden folgende Versuche unternommen :

Versuch 6 :

50 ul = 500 ug GDH werden abzentrifugiert, mit 100 ul Auftragslösung versetzt, die

vorher mit Stickstoff gesättigt wurde. Einsatz 50 ul = 250 ug pro Röhrchen. Die Essigsäure, mit der überschichtet wird, wurde ebenfalls vor Versuchsbeginn mit Stickstoff durchströmt. Laufzeit 120 min, Stromstärke 18 mA.
Es zeigt sich die Streifenverteilung wie ohne Vorbehandlung mit Stickstoff.

Versuch 7 :

400 ul GDH = 4 mg werden abzentrifugiert, in 20 ul EDTA (0, 5 g/l) und 300 ul Auftragslösung gelöst. Davon werden 50 ul pro Röhrchen aufgetragen = 625 ug. Laufzeit 120 min, Stromstärke 18 mA. Das Gel wurde anstelle von bidest mit einer Lösung von 0, 5 gr EDTA/l angesetzt.
Es ist wiederum die gleiche Streifenverteilung wie ohne EDTA zu sehen.

Versuch 8 :

Das wie üblich bereitete Gel wurde gegen eine Elektrodenlösung, die 35 % an Essigsäure und 5 M Harnstoff ist, also dem Gelsystem entspricht, einem Strom von 36 mA für die Dauer von 9o min ausgesetzt, um das restliche, durch die Polymerisation nicht verbrauchte Ammoniumperoxodisulfat aus dem Gel zu entfernen. Abb. 13.

Damit dürfte sich die Ursache der Aggregation als eine Oxydation reaktionsfähiger Gruppen des Enzyms durch Ammoniumperoxodisulfat darstellen. Womit aber noch nicht das an der Auftragsstelle liegengebliebene Protein gedeutet ist, ebenso die schwache mittelere Bande in Abb. 14. Damit dürfte die Gelbildung, die nach zwei Tagen zustande kommt, wenn man 5 mg GDH in 80 ul der Auftragslösung löst, durch eine andere auslösende Ursache zustande kommen als die Aggregatbildung bei der Elektrophorese, da ja im System der Auftragslösung Ammoniumperoxodisulfat nicht vorhanden ist.

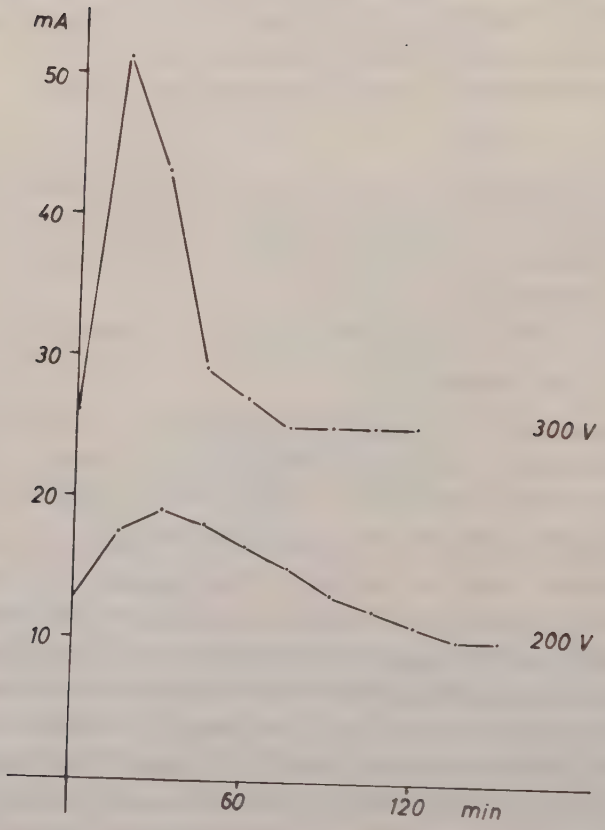



Abb. 13 : Man sieht sehr schön bei konstanter Spannung den Stromanstieg im ersten Teil der Elektrophorese. Vermutlich kommt dieser Anstieg auf Kosten des im elektrischen Feld aus dem Gel wandernden Ammoniumperoxodisulfat zustande.

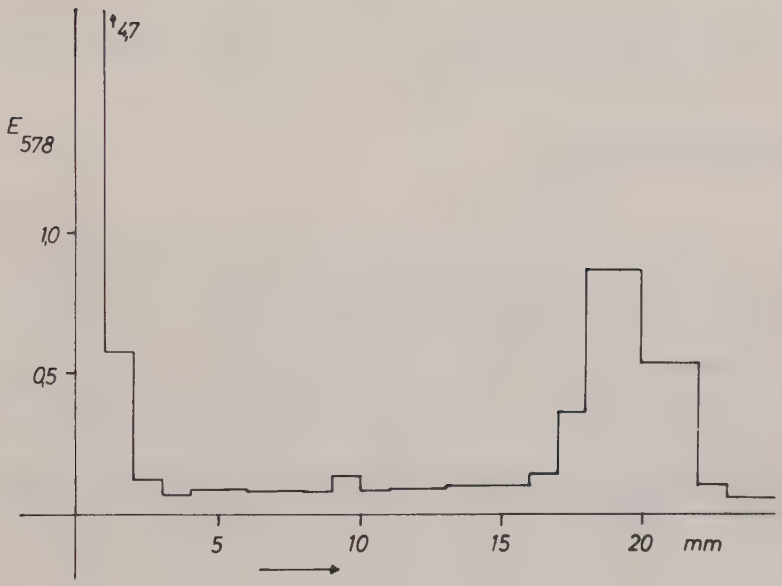



Abb. 14 : stellt das Ergebnis von Versuch 8 dar. Der Pfeil gibt die Laufrichtung an. mm Serienschnitte.

Versuche zur Sicherung oxydabler Gruppen im Molekül

Bei der Suche nach reaktionsfähigen Stellen im Enzym bieten sich wohl zu allererst - SH Gruppen an. Da sie ja leicht intermolekuläre -S-S- Brücken bilden können und somit auch den Reaktionsmodus einer Oxydation erfüllen würden.
Um die Hypothese der Aggregation über -S-S- Brücken zu stützen, bietet sich die Möglichkeit der Alkylierung von -SH Gruppen, deren Oxydation zu Sulfonsäuregruppen oder ihre beständige Reduktion durch ein zugesetztes Reducens.

Alkylierung mit Jodacetamid

Versuch 9 :

50 ul = 500 ug GDH werden abzentrifugiert, in 550 ul 8 M Harnstoff gelöst, mit 50 ul einer 0,1 M Lösung Jodacetamid versetzt, mit KOH auf $P_H$ = 11,4 eingestellt und vier Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Anschließend wird die Lösung eine 1/2 Stunde im Rotationsverdampfer eingedickt und mit 200 ul Eisessig angesäuert. Davon werden dann 100 ul pro Röhrchen aufgetragen. Laufzeit 120 min, Stromstärke 18 mA. Es zeigt sich Abb. 15.
An der Auftragsstelle ist etwas liegengeblieben, die starke, frontalwandernde Bande beginnt sich aufzuspalten, es zeigt sich eine schwache Nachfolgebande.

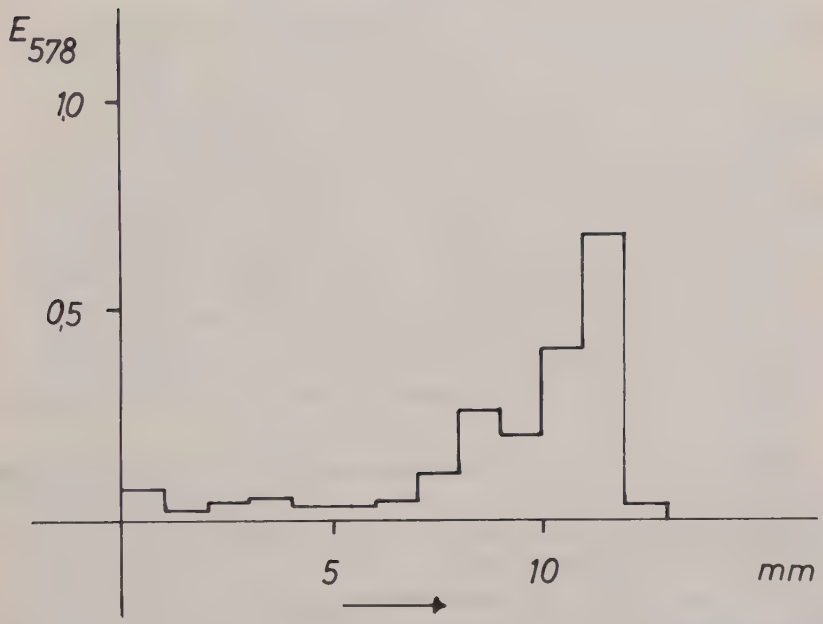



Abb. 15 : Der Pfeil gibt die Laufrichtung an. mm Serienschnitte.

Reduktion mit Mercapto - aethanol

Versuch 10 :

50 ul = 500 ug GDH werden abzentrifugiert, in 50 ul 8 M Harnstoff gelöst, dann 20 ul Mercapto - aethanol zugegeben. Es wurde 45 Stunden bei Zimmertemperatur inkubiert. Dann wird mit 50 ul Eisessig angesäuert. 30 ul dieser Lösung werden pro Röhrchen aufgebracht. Laufzeit 120 min, Stromstärke 18 mA.

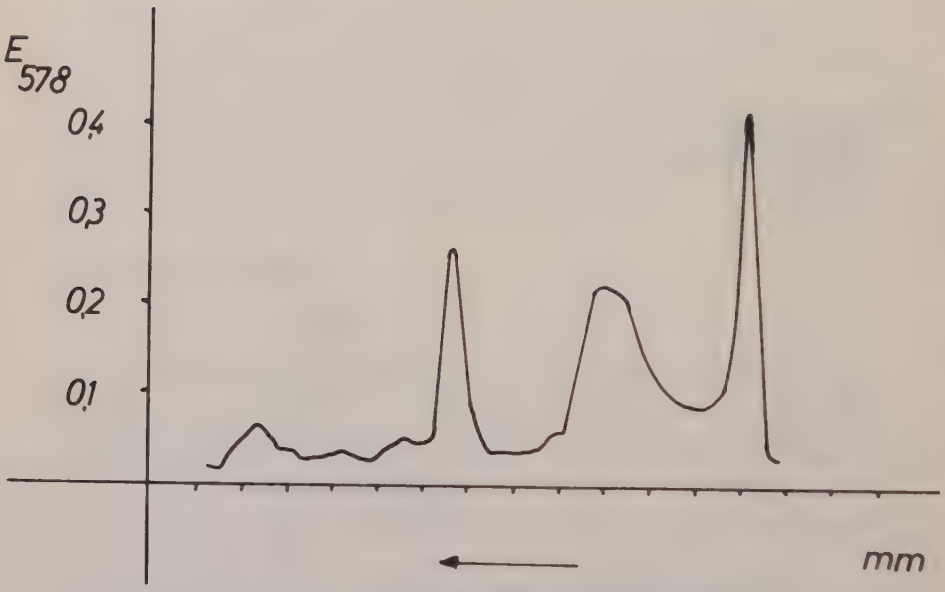



Abb. 16 : Der Pfeil gibt die Laufrichtung an.

Direkte Auswertung am Photometer. Eine Einheit auf der X - Achse entspricht 8,5 mm Gellänge.

Ergebnis von Versuch 10 :

Das ursprüngliche Streifenmuster ist eindeutig verschwunden. Das sich ergebende Bild ist aber nicht eindeutig zu erklären, da die verschiedenen Streifen sowohl Verunreinigungen des Proteins als auch durch die Wechselwirkung Enzym - Coenzym verursacht werden könnten. Ob die hier entstandenen vielfältigen Banden durch den Mechanismus erklärt werden können, mit dem FRITZ u. JACOBSON ( 20 ) die vermehrte Streifenbildung an LDH nach Gelelektrophorese deuten, bleibt dahingestellt. Sie konnten dabei 15 enzymaktive Streifen finden, wenn 0,005 M Mercapto - aethanol zum Gel gegeben wurde. Sie erklären diesen Befund als Enzym - Coenzymzwischenwirkung.

Oxydation mit Perameisensäure

(Die angegebenen Auftragsmengen beziehen sich auf 1 mg oxydierte Substanz die in 500 ul Eisessig und 500 ul 8 M Harnstoff gelöst ist).

Zunächst wurde die günstigste Laufzeit und die Art der Auftragslösung bestimmt. Hierbei zeigte es sich, daß das oxydierte Protein eine bedeutend geringere Wanderungsgeschwindigkeit zeigte, als das nicht oxydierte. Vermutlich ist diese Erscheinung auf das Entstehen von Sulfonsäuregruppen zurückzuführen, die die effektiv wirksame positive Ladung des Proteins im Sauern vermindern. Im Verlauf der Versuche zeigte es sich, daß eine Laufzeit von drei Stunden erforderlich ist. Da das oxydierte Protein in der sonst verwendeten Auftragslösung von Phenol : Eisessig : Wasser wie 2 : 1 : 1 und 2 M an Harnstoff nur schlecht löslich war, wurde eine Mischung von Eisessig : 8 M Harnstoff wie 1 : 1 verwendet.
Die Versuche wurden zunächst mit einer Oxydationsdauer von 60 min bei 0 Grad Celsius durchgeführt.

Versuch 11 :

50 ul der oxydierten Proteinlösung wurden pro Röhrchen aufgetragen. Laufzeit 120 min, Stromstärke 18 mA.
Es zeigt sich eine einheitliche Bande, an der Auftragsstelle ist nichts liegengeblieben. Abb. 17.

Versuch 12 :

Es wird Versuch 9 wiederholt, nur eine Laufzeit von 180 min bei einer Stromstärke von 18 mA. Es wurde die gleiche Charge verwandt. Die Bande scheint im Begriff zu sein sich aufzuspalten, wie nach Jodacetamidbehandlung. An der Auftragsstelle ist etwas liegengeblieben. Das liegengebliebene Protein scheint also nicht gelöstes Eiweiß zu sein. Versuchsergebnis in Abb. 17

Versuch 13 :

Gleiche Bedingungen wie im Versuch 11 nur mit einer anderen Charge. Laufzeit 120 min, Stromstärke 18 mA. Oxydationsdauer 15 Stunden.
Es zeigt sich neben der starken Bande eine schwächere und an der Auftragsstelle ist etwas liegengeblieben. Versuchsergebnis auf Abb. 17.

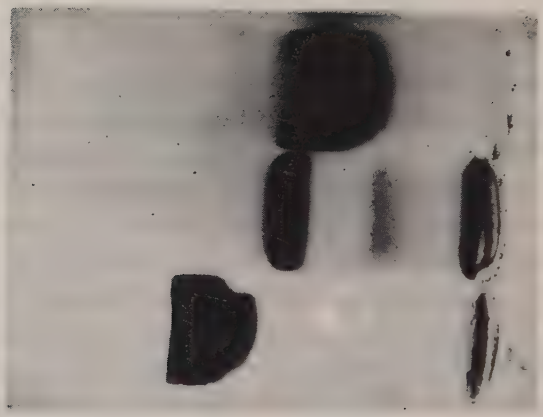


Abb. 17 : Der obere Streifen zeigt das Ergebnis von Versuch 11, der mittlere von Versuch 13 und der untere von Versuch 12.

Um zu erklären, ob die Veränderung des Bildes von Versuch 13 im Gegensatz zu Versuch 11 durch eine Verunreinigung des Proteins oder durch die Veränderung der Oxydationsdauer zustande kommt, werden die nächsten Versuche unternommen.

Versuch 14 :

Verschiedene Chargen werden jeweils eine Stunde oxydiert, dann werden je 50 ul der Proteinlösung pro Röhrchen aufgetragen.
Laufzeit 180 min, Stromstärke 18 mA.
Es zeigen sich teils stärker teils schwächer eine bis zwei schwache Banden zwischen der ersten großen Bande und der Auftragsstelle. An der Auftragsstelle bleiben wechselnde Mengen Protein liegen.

Versuch 15 :

Die Oxydationsdauer wird auf 15 Stunden verlängert. Wieder werden je 50 ul der oxydierten Lösung pro Röhrchen aufgetragen. Laufzeit 180 min, Stromstärke 18 mA. Es zeigt sich bei gleicher Charge das gleiche Bild, wie in Versuch 14 geschildert. Die gleichen schwachen Nebenbanden, Protein bleibt an der Auftragsstelle liegen.

Aus Versuch 11 bis 15 darf man wohl schließen, daß es sich bei den schwachen Nebenbanden um Proteinverunreinigungen des Kristallisates handelt. Ebenso dürfte sich das an der Auftragsstelle liegengebliebene Protein als Verunreinigung oder nicht ganz gelöstes Protein zeigen, da ja auch hier bei verschiedenen Chargen unterschiedliche Mengen, bzw. gar nichts, liegen bleiben.
Da, wie Abb. 17 zeigt, nach drei Stunden Laufzeit eine beginnende Auftrennung der großen Bande vorhanden ist, werden im folgenden Versuch höher vernetzte Gele verwendet um die Auftrennung deutlicher zu machen.

Versuch 16 :

Nach einer Oxydationsdauer von einer Stunde werden auf Gele mit steigendem Prozentsatz an Acrylamid je 20 ul bzw. je 50 ul der oxydierten Lösung aufgetragen. Laufzeit 180 min, Stromstärke 18 mA.

Acrylamid in Prozent : 10 %
11 %
12, 5%
15 %
25 %

Dabei zeigt sich folgendes, besonders schön an den Gelen zu sehen, auf die nur 20 ul aufgetragen wurden, da hier die Trennung klarer erfolgte : Die von vorher gewohnte starke, frontalwandernde Bande, spaltet sich in zwei Banden auf, wobei bei 10 % Gel die schnellere stärker ist als die langsamere, bei 12 % u. 15 % Gel aber die langsamere mit wachsender Gelvernetzung stärker wird als die erste schnellere Bande. Bei 25 % Gel konnte kein Protein mehr ins Gel eindringen. Bei allen Gelen blieb an der Auftragsstelle in steigendem Maße, parallel mit steigender Gelvernetzung, Protein liegen.

Abb. 18 zeigt den Zustand bei 11 % Gel, die beiden Banden, in die sich die große Bande aufgespalten hat, und Protein, das an der Auftragsstelle liegengeblieben ist. Es wurden 20 ul der oxydierten Lösung aufgetragen.
Da das an der Auftragsstelle liegengebliebene Protein, genauso bei einstündiger Oxydation und 7, 5 % Gel vorhanden ist (bei gleicher Charge), wie nach 15-stündiger Oxydation und 7, 5 % Gel dürfte man auch das liegengebliebene Protein in Versuch 16 als Proteinverunreinigung deuten, so daß die zwei vorhandenen Banden der GDH entsprechen müssen.

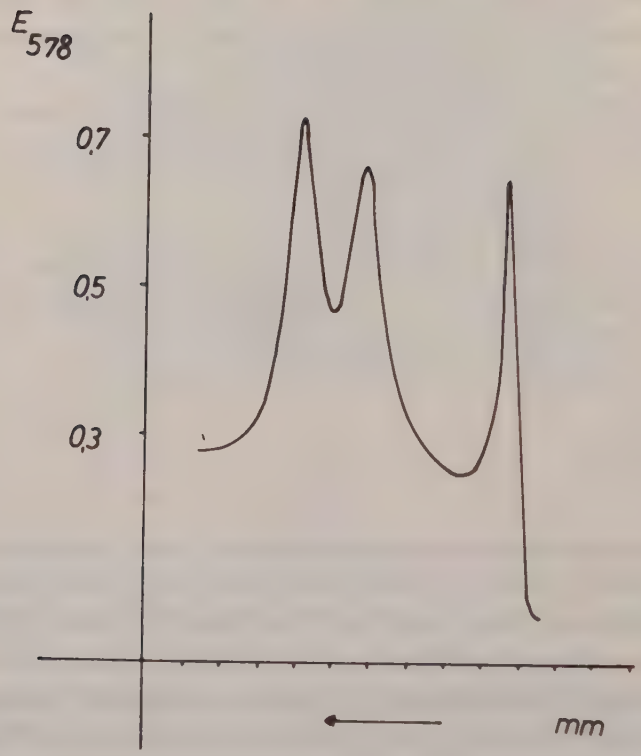



Abb. 18 : Ergebnis von Versuch 16 bei 11 % Gel. Der Pfeil gibt die Laufrichtung an. Direkte Auswertung am Photometer. Eine Einheit auf der X - Achse entspricht 8, 5 mm Gellänge.

Versuche mit kohlevorbehandelter GDH

Zur weiteren Absicherung des Befundes werden Versuche mit kohlevorbehandelter GDH unternommen, um die Möglichkeit der Bildung der schwachen Nachfolgebanden durch Enzym - Coenzym auszuschließen. Kohlebehandlung nach ANKEL ( 11 ). ANKEL hatte gefunden, daß sich die GDH, durch diese Behandlung nucleotidfrei machen läßt.

Versuch 17 :

400 ul kohlevorbehandelter GDH = 800 ug werden abzentrifugiert, in 100 ul Auftragslösung gelöst, davon 60 ul = 480 ug aufgetragen. Laufzeit 180 min, Stromstärke 18 mA. Es zeigt sich das gleiche Bild wie bei unbehandelter GDH mit der abnehmenden Streifenverteilung. Vergleiche Abb. 8.

Versuch 18 :

In einem Vorlauf ohne Protein wird gegen eine Elektrodenlösung von 5 M Harnstoff 35 % Essigsäure mit einer Laufzeit von 90 min bei 36 mA das Ammoniumperoxodisulfat aus dem Gel entfernt. Dann werden 500 ul kohlevorbehandelter GDH = 1 mg abzentrifugiert, in 80 ul Auftragslösung gelöst und hiervon 40 ul = 500 ug pro Röhrchen aufgetragen. Laufzeit 120 min, Stromstärke 18 mA. Es zeigt sich das gleiche Bild wie nach Versuch 8.

Versuch 19 :

500 ul kohlevorbehandelter GDH = 1 mg werden eine Stunde mit Perameisensäure oxydiert. Dann in 500 ul 8 M Harnstoff und 500 ul Eisessig gelöst, nachdem die Perameisensäure im Rotationsverdampfer abgedampft wurde. Von der Lösung werden je 20 ul aufgetragen. Laufzeit 180 min, Stromstärke 18 mA.
Gel 12 % an Acrylamid.
Man sieht deutlich die Aufspaltung in zwei Banden, so wie den Proteinrest der an der Auftragsstelle liegengeblieben ist, Abb. 19. Mit diesen Versuchen dürfte gesichert sein, daß die nach Vorlauf und Perameisensäureoxydation auftretenden Nebenbanden und die an der Auftragsstelle liegengebliebenen Proteinmengen nicht durch Apo - Coenzymwechselwirkungen zustande kommen können, so daß die bereits angegebene Hypothese der Verunreinigung des GDH-Kristallisates mit anderen Proteinen wahrscheinlich sein dürfte für die Erklärung dieser Erscheinung.

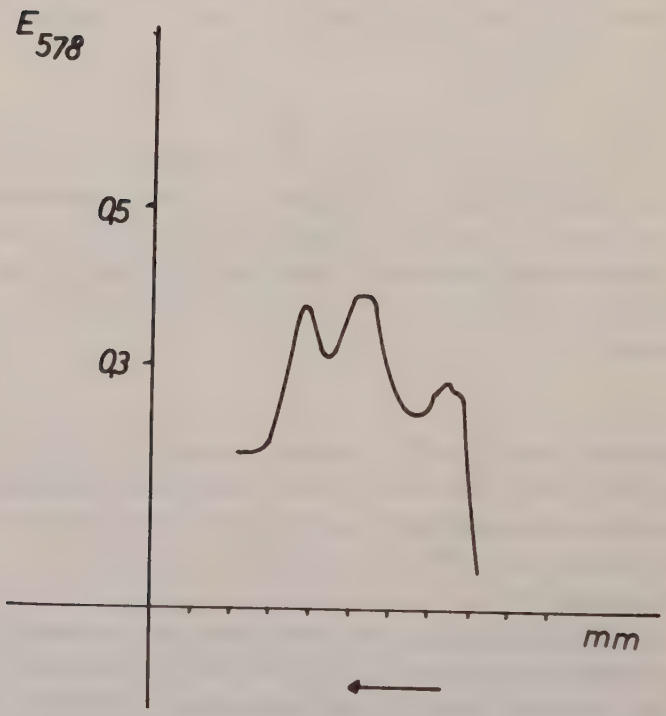



Abb. 19 : Ergebnis von Versuch 19. Direkte Auswertung am Photometer. Der Pfeil gibt die Laufrichtung an.
Eine Einheit auf der X - Achse entspricht 8, 5 mm Gellänge.

Diskussion der Versuche nach Vorbehandlung im Sauern mit 5 M Harnstoff

Auf Grund der dargestellten Versuche, darf man wohl annehmen, daß Aggregate über S-S- Brücken zustande kommen, also die -SH Gruppen des Enzyms durch Ammoniumperoxodisulfat zu Disulfidbrücken intermolekulärer Natur oxydiert werden. 1951 konnten HUGGINS, TAPLEY und JENSEN ( 6 ) eine Aggregatbildung von Rinderalbumin und Rindergammaglobulin klären auf Grund ihrer Gelbildung in Gegenwart von Harnstoff. Diese Gelbildung konnte durch Alkylierung mit Jodacetat verhindert und ein bereits gebildetes Gel durch Mercaptane wieder gelöst werden. Die Autoren schlagen dabei vor, daß es sich um eine Umwandlung intramolekulärer Disulfidbrücken in intermolekuläre handelt. Sie schlugen diese Hypothese vor, da die genannten Proteine nur über eine freie Thiolgruppe verfügen, so daß praktisch nur Dimere zustande kommen können. Ähnliche Untersuchungen stellte 1954 HALWER ( 5 ) mit Hilfe der Lichtbeugung an Eieralbumin an. Dabei fand er, daß denaturiertes Eieralbumin aus Aggregaten besteht, die wenigstens teilweise durch Disulfidbrücken verknüpft sind, gleichgültig, ob Denaturierung durch Hitze, Schütteln, Alkohol oder Harnstoff erfolgte. Auch er führt die Aggregation auf eine Umwandlung intra- in intermolekuläre Disulfidbrücken zurück. 1954 konnten MARINIS und OTT ( 21 ) Aggregate von Albumin mit Hilfe der Gelelektrophorese trennen, dabei ergab sich ein ähnliches Bild wie bei den hier geschilderten Versuchen mit der GDH.

In ähnlicher Richtung liegen die Untersuchungen von RYLE und SANGER ( 22 ) die 1955 bei der Hydrolyse von Proteinen die Bildung von Disulfidbrücken beobachten konnten.

Im Gegensatz zu den hier angeführten Versuchen von HALWER und HUGGINS et al. dürfte es sich bei den Untersuchungen an der GDH eher um eine Nachahmung physiologischer Zustände handeln, da hier wie dort -SH Gruppen oxydierende Substanzen vorliegen, deren Wirkungen durch Reduktionsmittel, hier etwa Mercaptoaethanol, dort etwa Glutathion wieder rückgängig gemacht werden können, während es bei den Versuchen von HUGGINS et al. und HALWER lediglich um eine Umlagerung bereits vorhandener Disulfidbrücken handelt.

Zur Frage der Enzymuntereinheiten ist festzustellen : Die Befunde nach Alkylierung mit Jodacetamid und vor allem die Oxydation mit Perameisensäure lassen, neben Versuch 2 (bei verlängerter Laufzeit), wo sich ja auch die erste Bande in zwei Streifen

aufspaltet, die Deutung durch die Hypothese zu, daß die GDH aus zwei verschiedenen Untereinheiten besteht, wenn gleich dafür mit den gezeigten Versuchen kein völlig sicherer Beweis erbracht werden konnte.

Zusammenfassung :

Es wurden Versuche unternommen, einmal methodischer Art, um Pherogramme auswerten zu können. Die einzelnen Banden wurden quantitativ messbar gemacht, in dem der Farbstoff Amidoschwarz mit RBS 25 eluiert wurde. Der Farbstoff zeigt nach 4 Stunden keine Abnahme der Extinktion. Es ergab sich für Amidoschwarz eine E / ug / ml von 0,0505. Es konnte gezeigt werden, daß die Extinktion eines eluierten Pherogramms der GDH bei gleichen Proteinmengen mit der Zeit ansteigt. Als Erklärung wird angeführt, daß es zu einer Kettenbildung der Farbstoffmoleküle kommt. Nach Extrapolation der Kurve wird der Wert des gebundenen Amidoschwarz an einem Mol GDH berechnet. So dann werden steigende Mengen GDH einer Elektrophorese unterworfen und die Extinktion von Amidoschwarz aufgezeichnet. Es zeigt sich, daß diese Kurve nach der Gleichung

$$E = 2 \ (1 - e^{- 0,0095 \, ug})$$

verläuft.

Zweitens wurden Versuche mit der GDH angestellt um die Erscheinungsformen zu deuten, die bei der Elektrophorese entstehen. Im alkalischen Milieu zeigt sich ein charakteristisches Bild, daß aus einer starken, frontalwandernden Bande und vielen kleinen Nachfolgebanden besteht. Enzymatische Aktivität besitzt nur die starke frontale Bande. Im sauren Bereich mit 5 M Harnstoff zeigen sich in ihrer Stärke abnehmende Banden, deren Extinktionswerte auf einer Kurve der allg. Form

$$y = a \, e^{- b \, x}$$

liegen. Bei verlängerter Laufzeit und geringerer Proteinmenge wird eine Aufspaltung der ersten Bande in zwei sichtbar.

Nach Dialyse bzw. Einfrieren und Wiederauftauen ändert sich nichts am Erscheinungsbild. Um diese Erscheinung als Aggregation zu deuten, werden theoretische

und experimentelle Überlegungen angestellt. Es wird eine Theorie entwickelt, aus der eine ähnliche Kurve wie die experimentell gefundene zu berechnen ist.
Einen experimentellen Hinweis für die Hypothese der Aggregation liefert der Versuch, bei dem mit steigender Gelvernetzung die langsamer wandernden Banden nacheinander ausgeschlossen werden können. Die Veränderung der Geschwindigkeit der Aggregate im elektrischen Feld wird durch veränderte Reibung und veränderte elektrophoretische Beweglichkeit auf Grund der steigenden Molekülgröße erklärt. Um den Mechanismus der Aggregation zu finden, wird eine Luftoxydation durch Sauerstoff mit Hilfe von Stickstoffsättigung, eine Wirksamkeit von Schwermetallen durch Zusatz von EDTA ausgeschlossen. Nach einem Vorlauf, durch den das Ammoniumperoxodisulfat entfernt wird, tritt die Aggregation nicht mehr auf, sie muß also auf einer Oxydation durch Ammoniumperoxodisulfat beruhen. Um die Möglichkeit einer Oxydation von Thiol-Gruppen zu Disulfidbrücken zwischen den Molekülen zu untersuchen, wird die GDH einmal durch Jodacetamid alkyliert, zum anderen mit Mercaptoaethanol reduziert bzw. mit Perameisensäure oxydiert. Die Erscheinungen der Aggregation verschwinden dabei, es muß sich also um eine Disulfidbrückenbildung zwischen den einzelnen Molekülen handeln. Es wird versucht schwächere Banden und an der Auftragsstelle liegengebliebenes Protein, die bei den Versuchen auftreten, als Verunreinigungen zu deuten, da auch Untersuchungen mit nucleotidfreier GDH gleiche Befunde wie nucleotidhaltige GDH zeigen. Die Experimente mit längerer Laufzeit, Jodacetamidbehandlung und vor allem mit Perameisensäure oxydierter GDH lassen die Möglichkeit einer Deutung zu, daß die GDH aus zwei verschiedenen Untereinheiten besteht, wenn gleich dafür kein sicherer Beweis geliefert werden konnte.

LITERATURVERZEICHNIS


1) RAYMOND, WEINTRAUB : Science 130, 711 ( 1959 )

2) ORNSTEIN, DAVIS : A new high resolution electrophoresis method. Delivered at the Society for the Study of Blood at the New York Academy of Medicine
ORNSTEIN : J. Histochem. Cytochem. 7, 291

3) SMITHIES : Biochem. J. 61, 629 ( 1955 ) Advan. Protein Chem. 14, 65 ( 1959 )

4) MARKERT, MØLLER : Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 45, 753 ( 1959 )

5) HALWER : Journ. Amer. Chem. Soc. 76/I 183 ( 1954 )

6) HUGGINS et al. : Nature 167, 592

7) SHANDON : Betriebsanleitung zum Shandon - Acrylamid - Säulenelektrophorese - Gerät ( Disc Electrophoresis )

8) TAKAYAMA et al. : Arch. Biochem. Bioph. 114, 223 ( 1964 )

9) KOHLRAUSCH : Ann. Physik. 62, 209 ( 1987 )

10) WIEME : Amsterdam, London, New York ( 1965 ) S. 157

11) ANKEL : Dissert. Marburg ( 1960 )

12) BÜCHER, LUH, PETTE : Hoppe - Seyler / Thierfelder Handbuch der Physiologisch - und Pathologisch - chemischen Analyse, 10. Auflage VI / A ( 1964 )

13) BEISENHERZ et al. : Ztschr. f. Naturforschung 8 b, 10, 576 ( 1953 )

14) GRASSMANN, HANNIG : Hoppe - Seyler Z. physiol. Chem. 290, 1, ( 1952 )

15) van EYS et al. : Biochem. 3, 11, 1755 ( 1964 )

16) URIEL : Clin. Chin. Acta 3, 234 ( 1958 )

17) TSAO : Arch. Biochem. 90, 234 ( 1960 )

18) ORNSTEIN : Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 2, 321

19) HENRY : Proc. Roy. Soc. A 133, 106 ( 1931 )

20) FRITZ, JACOBSON : Science 140, 64 ( 1963 )

21) MARINIS, OTT : Proc. 11$^{th}$ Colloqu. Bruges ( 1964 )

22) RYLE, SANGER : Biochem. J. 60, 535 ( 1955 )

## Mein Lebenslauf

Am 13.8.1941 wurde ich als Sohn des Lehrers Fritz Ebner und seiner Frau Maria, geb. Oswald, in Freising geboren. Meine Kindheit verbrachte ich in Allershausen/Obb., wo ich auch von 1947 bis 1952 die Volksschule besuchte. 1952 wechselte ich in das Humanistische Gymnasium des Benediktinerklosters Scheyern über. Ich wohnte im angeschlossenen Studienseminar. 1961 schloß ich die Höhere Schule mit der Reifeprüfung ab.

Ein folgendes halbes Jahr war ich in Beauvais (Frankreich) als maître d' internat tätig. 1962 begann ich in München das Studium der Medizin, das ich 1968, nach 11semestrigem Studium, mit der ärztlichen Prüfung abschloß. Während der klinischen Semester arbeitete ich unter Anleitung von Prof. Dr.Dr.Th.Bücher im Physiologisch-chemischen Institut der Universität an meiner Dissertation.